CITRAT-LYASE VON RHODOPSEUDOMONAS GELATINOSA.

Anreicherung, Charakterisierung und Aufbau des Enzyms.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Norbert Beuscher
aus Göttingen

Göttingen 1974

CITRAT-LYASE VON RHODOPSEUDOMONAS GELATINOSA.

Anreicherung, Charakterisierung und Aufbau des Enzyms.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Norbert Beuscher
aus Göttingen

Göttingen 1974

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV. LEIDEN BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 1. November 1974

Meinen Eltern gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0022

Abkürzungen

ACP	Acetyl-Carrier-Protein
Ammoniumpersulfat	Ammoniumperoxydisulfat
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
CL	Citrat-Lyase
CoA-SH	Coenzym A
Dansyl(chlorid)	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulphonyl(chlorid)
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DTE	Dithioerytrit
DTNB	5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat
DTT	Dithiothreitol
E	Enzymeinheit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GSH	reduziertes Glutathion
Hyamin-OH	p(Diisobutyl-cresoxyäthoxyäthyl)-dimethyl-benzyl-ammoniumhydroxid
KPO_4	Gemisch von KH_2PO_4 und K_2HPO_4
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MET	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
$NAD(H_2)$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
P_a	anorganisches Phosphat
(Dimethyl)POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA	Triäthanolamin(hydrochlorid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

		Seite
EINLEITUNG		1
EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE		4
1.	Phototrophes Wachstum von Rhodopseudomonas gelatinosa auf Citrat und anderen organischen Säuren	4
2.	Experimente zur Ermittlung optimaler Ausgangsbedingungen für eine Anreicherung der Citrat-Lyase	7
2.1.	Vergleich der Citrat-Lyase-Aktivität in frischen, tiefgefrorenen, lyophilisierten und in Glycerin aufbewahrten Zellen	7
2.2.	Ermittlung des geeigneten Aufschlußverfahrens	8
2.3.	Reaktivierung und Bestimmung der Citrat-Lyase-Aktivität sowie Analyse der Reaktionsprodukte	11
3.	Anreicherung der Citrat-Lyase	21
3.1.	Reinigung des Rohextraktes durch Ultrafiltration und Zentrifugation	24
3.2.	Ionenaustauscher-Säulenchromatographie	24
3.3.	Gelfiltration und Analyse des gereinigten Enzympräparates	25
4.	Charakterisierung der Citrat-Lyase	32
4.1.	Kinetische Eigenschaften der Citrat-Lyase	32
4.1.1.	Optimierung der Reaktivierungs- und Testmethoden	32
4.1.2.	Experimente zur Inaktivierung der Citrat-Lyase	38
4.1.3.	Metallionenbedürfnis	45
4.1.4.	Bestimmung des pH-Optimums	48
4.1.5.	Ermittlung von Substratsättigungs- und K_m-Werten	50
4.2.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese als Methode zur Untersuchung von Reinheit und Aufbau der Citrat-Lyase	58
4.2.1.	Analytische Disk-Elektrophorese	58

Seite

4.2.2. Kontinuierliche Plattenelektrophorese 61

4.2.3. Natriumdodecylsulfat- und Harnstoff-Gel-Elektrophorese; Bestimmung von Zahl und Größe der Untereinheiten 67

4.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Citrat-Lyase und ihrer Untereinheiten 77

4.3.1. Analytische Ultrazentrifugation 77

4.3.2. Dichtegradienten-Zentrifugation 83

4.3.3. Säulenchromatographie mit Sepharose 6 B 87

4.3.4. Trennung der Untereinheiten der Citrat-Lyase durch Säulenchromatographie 90

4.4. Untersuchungen zur Feinstruktur der Citrat-Lyase 94

4.4.1. Elektronenoptische Darstellung 94

4.4.2. Bestimmung von SH-Gruppen 100

4.4.3. Bestimmung von Pantothensäure 103

4.4.4. Radioaktive Markierung mit 1,5-^{14}C-Citrat 110

DISKUSSION 116

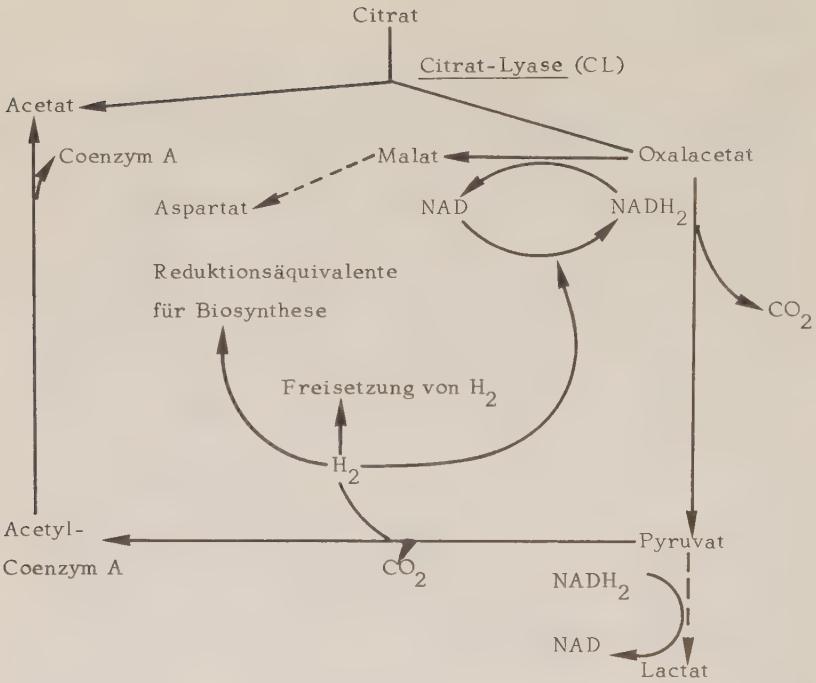
ZUSAMMENFASSUNG 135

METHODEN 137

LITERATURVERZEICHNIS 166

EINLEITUNG

Die zu den Rhodospirillaceae gehörenden phototrophen Bakterien können im allgemeinen mit Mono- und Dicarbonsäuren als C-Quelle gut unter anaeroben Bedingungen im Licht wachsen (KOHLMILLER et al., 1951; GEST et al., 1962; PFENNIG, 1969; TSUKI et al., 1963; ANDERSON et al., 1966; UFFEN et al., 1970). Dagegen sind nur wenige Arten befähigt, Citrat als C-Quelle zu nutzen (PFENNIG, 1969). Gutes Wachstum mit Citrat wurde für einige Stämme von Rhodopseudomonas gelatinosa beschrieben (VAN NIEL, 1944; PFENNIG, 1964). SCHAAB et al. (1972) zeigten, daß Rhodopseudomonas gelatinosa, Stamm SMG 149, zu einem ungewöhnlich raschen Abbau des Citrats in der Lage ist. Die gleichen Autoren wiesen außerdem folgende, für das Verständnis des Citratstoffwechsels von Rhodopseudomonas wichtige Details nach: Die beim Abbau des Citrats entstehenden Spaltprodukte, Acetat und Malat, werden größtenteils in das Medium ausgeschieden und nach Aufbrauch des Citrats für die Biosynthese von Zellsubstanz verwendet. Die beiden Spaltprodukte entstehen im Zuge der Citrat-Lyase-Reaktion; zusätzlich entsteht Acetat durch Oxidation eines Teil des Oxalacetats. Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so kann folgender Abbauweg für das Citrat angegeben werden:



Schema 1 Abbauweg des Citrats in Rhodopseudomonas gelatinosa

Das Schema basiert auf den zuvor im Text beschriebenen in-vivo Beobachtungen und dem Nachweis radioaktiv markierter Reaktionsprodukte, nach Umsetzung von ^{14}C-Citrat durch zellfreie Extrakte von Rps. gelatinosa (Kapitel 2.3., Tab. 6).

Der erwähnte äußerst rasche Abbau des Citrats stand zunächst im krassen Widerspruch zu der geringen CL-Aktivität, die in zellfreien Extrakten von Rps. gelatinosa nachweisbar war. Ein Ansatzpunkt zur Klärung der Diskrepanz zwischen in-vivo- und in-vitro-Aktivität der CL ergab sich aus den Untersuchungen von BUCKEL et al. (1971). Diese Autoren zeigten für die CL aus Klebsiella aerogenes, daß es sich bei dem aktiven Enzym um ein S-Acetyl-Protein handelte, das durch Desacetylierung in eine inaktive Form über-

gehen konnte. Wurde dieses inaktive Enzym mit Acetanhydrid inkubiert, so erhielt es 70 % seiner Aktivität zurück. Als Erklärung für die geringen Aktivitäten der CL in Rhodopseudomonas erschien es daher nicht abwegig, anzunehmen, daß in den zellfreien Extrakten der größte Teil der Enzymmoleküle bereits in der katalytisch inaktiven Form vorlag.

Eine Bestätigung dieser Vermutung erbrachten Befunde von GIFFHORN et al. (1972). Es zeigte sich, daß CL nur dann in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden konnte, wenn die Zellen noch aktiv Citrat verwerteten, d. h. zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen mußte noch Citrat in der Nährlösung vorhanden sein. Nach Inkubation dieser Extrakte mit Acetanhydrid konnte deutliche CL-Aktivität nachgewiesen werden. Als Folgerung ist auf Grund der geschilderten Ergebnisse festzuhalten:

1. Das Verhalten der CL aus Rps. gelatinosa in Bezug auf die Inaktivierung ist dem der CL aus Klebsiella aerogenes ähnlich.
2. Die Inaktivierung ist Teil eines biologischen Regulationsmechanismus, der es dem Bakterium erlaubt, nach Aufbrauch des Citrats die Lyaseaktivität abzuschalten. Damit ist die Möglichkeit zur Glutamat-Bildung, die ausgehend von Oxalacetat und Acetyl-CoA über Citrat verläuft, gegeben, ohne daß eine sinnlose Hydrolyse von Citrat diesen Syntheseschritt unmöglich macht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein Verfahren zur Isolierung von reiner CL aus Rps. gelatinosa auszuarbeiten und das Enzym eingehend zu charakterisieren. Beides war Voraussetzung für eine Untersuchung des Regulationsmechanismus, dem dieses Enzym in der lebenden Bakterienzelle unterworfen ist.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Phototrophes Wachstum von Rhodopseudomonas gelatinosa auf Citrat und anderen organischen Säuren

Rhodopseudomonas gelatinosa wurde in der von GIFFHORN et al. (1972) beschriebenen Nährlösung angezogen, die Citrat in Konzentrationen von 5 - 10 mM enthielt (s. "Methoden"). Wurden die Zellen auf diesem Wege kultiviert, so lag die durchschnittliche Ausbeute bei 1,3 g Feuchtgewicht, was einer optischen Dichte von etwa 0,8 bei 650 nm entsprach. Für die Anreicherung der CL in größerem Maßstab war es erforderlich, möglichst viel Zellmaterial mit hoher CL-Aktivität zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde bei Massenkulturen (s. "Methoden") nach Aufbrauch des Citrats mit einem 1,5 l Konzentrat der kompletten Nährlösung nachgefüttert. Hierdurch ließ sich eine Steigerung der Zellausbeute um den Faktor 2 erzielen.

Es zeigte sich auch, daß eine Erhöhung des Citrat-Angebotes in der Nährlösung auf 20 mM Endkonzentration wenig sinnvoll war, da dies eine vermehrte Schleimbildung zur Folge hatte, während die Zellausbeute konstant oder sogar leicht rückläufig war. In Tabelle 1 werden die verwendeten Anzuchtverfahren miteinander verglichen.

Tab. 1 Zellausbeute und CL-Aktivität nach Anzucht von Rps. gelatinosa unter verschiedenen Bedingungen

Anzuchts-dauer (Std.)	Ausbeute als Feucht-gewicht (g/l)	Spez. Akt. der CL (E/mg) (-) Ac	(+) Ac	Citrat Konz. (mM)	Endextink-tion (E_{650})
15	0,70	0,271	0,470	10	0,58
19	0,98	0,078	0,538	10	0,58
24	1,25	0,008	0,533	10	0,85
26	1,43	0	0,513	10	0,93
24				10	
+	1,9	0,032	1,80	+	1,27
24				10	
24				10	
+	1,40	0,047	2,87	+	1,08
12				10	

Durch (+)/(-) Ac wurden mit/ohne Inkubation mit Acetanhydrid erzielte CL-Aktivität gekennzeichnet. Die Angaben + 24 (12) in der Spalte Anzuchtsdauer bzw. + 10 in der Spalte Citrat-Konzentration zeigen wie lange und bei welcher Anfangskonzentration nachgefütterte Kulturen wuchsen.

Sicherlich stellt das beschriebene Verfahren zur Massenkultur nicht das optimalste dar. So sind vor allem zwei Parameter limitierend:

Während des Wachstums wird die Lichtausbeute für die einzelne Zelle trotz Umwälzung mittels magnetischer Rührung durch Zunahme der Bakteriendichte ständig schlechter. Als zweiter Faktor ist der pH-Wert zu nennen, welcher sich während des Wachstums von 6,7 auf 7,5 - 8,0 verschob. Zweifellos ist aber das von uns gewählte Verfahren zeitlich und apparativ wenig aufwendig. Für einige Experimente war es wünschenswert, Citrat-Lyase

freie Zellextrakte zu erzielen. In solchen Fällen wurde Rps. gelatinosa in der angegebenen Nährlösung (s. "Methoden) auf 10 mM Malat statt Citrat über mehrere Passagen kultiviert. Das Wachstum auf Malat war bedeutend geringer als auf Citrat; in ausgewachsenen Kulturen wurden max. Extinktionswerte von E_{650} = 0,4 erreicht. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den von SCHAAB et al. (1972) gemachten Angaben. Weiterhin fanden die genannten Autoren, daß auf Malat angezogene Zellen in einem Nährmedium mit äquimolaren Citrat- und Malatkonzentrationen Citrat sehr viel schneller abbauten als Malat. Daraus lassen sich zwei Schlüsse ziehen:

1. Die Induktorwirkung des Citrats auf das abbauende Enzym (Citrat-Lyase) ist auch in Gegenwart von Malat vorhanden.

2. Auch in Malat-gewachsenen Zellen ist Citrat-Lyase in einem Grundlevel vorhanden; dieser dient bei Umstellung auf Citrat-Abbau als Ausgangsbasis für eine weitere Induktion des Enzyms.

In eigenen Experimenten waren in Extrakten aus Zellen, die aus Succinat-Stammkulturen kommend fünfmal in frisches Nährmedium mit Malat übertragen worden waren, noch CL-Aktivitäten von 0,15 - 0,2 E/mg nachweisbar. Ersetzte man aber Malat durch Acetat, so war nach Durchführung der vorstehenden Prozedur in zellfreien Extrakten keine CL-Aktivität mehr vorhanden.

Als Konsequenz aus diesen Experimenten war ein Kultivierungsverfahren auszuwählen, das einen möglichst günstigen Kompromiß zwischen Zellausbeute und Lyaseaktivität darstellte und damit geeignet war als Standard-Anzucht zu dienen. Diese Bedingungen erschienen bei dem in Tabelle 1 in der letzten Zeile aufgeführten am besten erfüllt zu sein. Für zellfreie Extrakte ohne CL-Aktivität wurden Acetat-gewachsene Zellen als Ausgangsmaterial gewählt.

2. Experimente zur Ermittlung optimaler Ausgangsbedingungen für eine Anreicherung der Citrat-Lyase

2.1. Vergleich der Citrat-Lyase-Aktivität in frischen, tiefgefrorenen, lyophilisierten und in Glycerin aufbewahrten Zellen

In der Literatur sind eine Reihe von Verfahren zur Konservierung von Bakterienzellen beschrieben, welche die Erhaltung der Aktivität einer Vielzahl von Enzymen garantieren (HUGO, 1954; GUNSALUS, 1955). Solche Erfahrungswerte sind jedoch nicht ohne weiteres von einem Enzym auf das andere übertragbar, da eine Vielzahl von unkontrollierbaren Faktoren eine Rolle spielen können. Für die Citrat-Lyase aus E. coli und die ATP-Citrat-Lyase aus Kükenleber sind von WHEAT und AJL (1955) sowie SRERE (1959) Anreicherungen beschrieben, die tiefgefrorenes Ausgangsmaterial benutzen. Zu Beginn der Arbeiten mit der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa wurden ebenfalls gefrorene Zellen zur Herstellung des Rohextraktes verwendet. Dabei stellte sich heraus, daß auch durch die im weiteren noch zu beschriebenden Reaktivierungsverfahren keine reproduzierbaren Ausgangsaktivitäten erzielbar waren. Demzufolge mußte bereits während der Aufbewahrung der ganzen Zellen Enzymaktivität unwiederbringlich verlorengehen. Da noch nicht zu entscheiden war, ob dies eine unumstößliche Gegebenheit war, oder ob eine Variation der Konservierung weiterhelfen würde, lag es nahe, zunächst verschiedene Methoden zu vergleichen (Tab. 2).

Als Ergebnis dieser Experimente konnte festgehalten werden, daß eine Produktion von Zellmasse auf Vorrat, was eine Konservierung beinhaltet, zur Anreicherung der Citrat-Lyase nicht anzuraten war. Zwar ließ sich der Aktivitätsverlust durch die Methoden II und III erträglicher gestalten; er lag jedoch immer noch weit über dem tolerierbaren. Als Ausweg bot sich nur an, viel Zellmasse auf einmal zu produzieren und diese dann frisch für die Anreicherung zu verwenden.

Tab. 2 Ausgangsaktivität der CL in zellfreien Extrakten, in Abhängigkeit von Zeit und Art der Aufbewahrung der Bakterienzellen

Zeit	Konservierungsart I tiefgefroren, -18° C		II tiefgefroren, lyophilisiert		III Trockeneis tiefgefroren, lyophilisiert		IV 30 % Glycerin, -18° C	
(d)	(E/mg)	%	(E/mg)	%	(E/mg)	%	(E/mg)	%
0	0,271	100	0,412	100	0,421	100	0,078	100
5	0,200	74	0,372	79	0,35	85	0,051	65
10	0,113	41	-	-	0,33	80	-	-
15	0,072	27	0,22	54	0,28	68	0,04	51
20	0,035	13	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	0,045	58
30	0,038	14	0,157	38	0,19	46	0,038	49

Die Bakterienzellen wurden einheitlich mit Ultraschall aufgeschlossen (s. "Methoden"). Die angegebenen Enzymaktivitäten wurden durch Aktivierung mit Acetanhydrid (1,75 mM) erzielt. Ohne Acetylierung der zellfreien Extrakte war nur geringe CL-Aktivität (0,03 E/mg) am Anfang (0 - 5 d) meßbar. Als Maß für die Aktivität sind angegeben: Die spez. Aktivität in E/mg und zur besseren Verfolgung des Aktivitätsverlustes Prozentangaben, bezogen auf die jeweilige Ausgangsaktivität gleich 100 %. Die Ausgangsaktivität bei Methode IV wurde bereits in Gegenwart von 30 % Glycerin bestimmt, ohne diesen Zusatz war sie mit der in I angegebenen identisch.

2.2. Ermittlung des geeigneten Aufschlußverfahrens

Ein Aufschlußverfahren für Bakterienzellen kann als gut bezeichnet werden, wenn es zwei wichtige Anforderungen erfüllt: Einmal soll es die Zellen so weit zerstören, daß die Zellinhaltsstoffe in die Lösung austreten können; zum anderen sollen die bereits gelösten Proteine möglichst wenig beschädigt werden. Eine Veränderung der Konformation eines Proteins zieht meist

einen Verlust an katalytischer Aktivität nach sich. Solche Konformationsänderungen werden durch Energiezufuhr bewirkt, insbesondere durch Wärmeenergie, die bei vielen Aufschlußverfahren infolge der hohen Reibungswerte entsteht. Bei den hier verwendeten Aufschlußverfahren wurden alle Maßnahmen getroffen, um die anfallende Wärme abzuführen und damit die Überschreitung einer Maximaltemperatur von $+4^{\circ}$ C zu verhindern. Zusätzlich wurde, da eine Sauerstoffinaktivierung nicht auszuschließen war, mit Stickstoff überschichtet. Neben physikalischen Aufschlußverfahren wurden auch Substanzen verwendet, die gezielte Eingriffe in die Struktur der Zellwand bzw. cytoplasmatischen Membran vornehmen, sowie Kombinationen beider Verfahren (Tab. 3).

Tab. 3 Citrat-Lyase-Aktivität in zellfreien Extrakten in Abhängigkeit von der Art des Zellaufschlusses

Aufschlußmethode		Protein (mg/ml)	Enzymaktivität (E/mg) (+) Ac	(-) Ac	Gesamtaktivität (E)
I Lysozym; EDTA; DNase; 1 x French-Presse		26,9	0,5	0,02	134,5
II Lysozym; EDTA; DNase; 2 x French-Presse		34,7	0,33	0,02	113,5
III Lysozym; EDTA; DNase; 3 x French-Presse		32,9	0,25	0,02	81,9
IV French-Presse	1 x	11,8	0,68	0,15	80,7
	2 x	15,4	0,54	0,09	82,4
	3 x	20,8	0,31	0,02	63,4
V Ultraschall Desintegrator (6 Min.)		23,2	0,09	0,03	19,7

Detaillierte Angaben zu den Aufschlußverfahren s. "Methoden" 4. a - d. Das Volumen der aufzuschließenden Bakteriensuspensionen betrug 10 ml (I - IV) bzw. 5 ml (V). (+)/(-) Ac ≙ mit/ohne Acetanhydrid Aktivierung (s. Legende zu Tab. 1.

Zunächst wurde versucht, Zellen von Rps. gelatinosa auf möglichst schonendem Weg aufzuschließen. Bereits durch Einfrieren und Auftauen werden Zellwände zum Teil geschädigt, da sich während des Einfriervorgangs in den Zellen keine Eiskristalle bilden, die den durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Kräfte aufrechterhaltenen Zusammenhalt zwischen Proteinen und Lipiden schwächen (SANADI et al., 1952). Solchermaßen "vorbereitete" gram-negative Bakterienzellen (E. coli, S. typhimurium) können dann mittels osmotischem Schock (CHARM, 1971) vollständig aufgeschlossen werden (NEU et al., 1967; HEPPEL, 1969). Im Fall von Rps. gelatinosa erwies sich ein solches als nicht effektiv.

Bei vielen gram-negativen Bakterien muß - soll eine Lysozym-Behandlung wirkungsvoll sein - ein Metall-chelatisierendes Agenz (EDTA) zugesetzt werden. Lysozym wurde in Kombination mit EDTA oder Polymyxin B, einem Polypeptidantibiotikum mit "lysierender" Wirkung auf cytoplasmatische Membranen (FRANKLIN, 1973), eingesetzt. Mit letzterem hatte KLEMME (persönliche Mitteilung) gute Erfolge im Aufbrechen der Zellen von Rps. capsulata, einem ebenfalls gram-negativen phototrophen Pseudomonaden erzielt. Bei Rps. gelatinosa dagegen war nach dieser Methode kein Aufschluß erreichbar. Erst als solchermaßen vorinkubierte Proben noch zusätzlich mit der French-Presse behandelt waren, konnten Protein und enzymatische Aktivität in der Lösung nachgewiesen werden. Der Grund, weshalb Lysozym und Polymyxin B eine schlechte Wirkung zeigten, war vermutlich darin zu suchen, daß die Schleimhülle der Zellen einen innigen Kontakt zwischen Lysozym/Polymyxin B und der Zellwand verhinderte. Andererseits waren die Zellen mit der French-Presse (Hochdruckzelle nach FRENCH et al., 1950) schon nach einmaliger Behandlung zu mehr als 90 % aufgeschlossen. Auch gegenüber der Ultraschallbehandlung erwies sich diese Methode als überlegen, da bei gleichem Proteingehalt die enzymatische Aktivität der CL (s. Tab. 3) mehr als dreimal so hoch war. Daraus wurde geschlossen, daß die Ultraschallbehandlung bei der CL zu einem irreversiblen Aktivitätsverlust führte. Die Richtigkeit dieser Folgerung bestätig-

ten Experimente, in denen Lyase-Aktivität und Dauer der Ultraschallbehandlung verfolgt wurden. Aus Tab. 4 geht hervor, daß spezifische- und Gesamtaktivität nach Erreichen eines Maximums (6 Min.) im weiteren Verlauf des Aufschlusses stark zurückgehen.

Tab. 4 Aktivität der Citrat-Lyase in zellfreien Extrakten in Abhängigkeit von der Länge der Ultraschallbehandlung

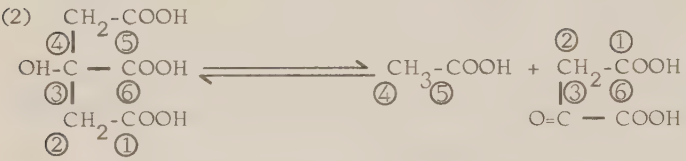
Beschall-dauer (Min.)	Protein (mg/ml)	Ges.Protein (mg)	spez. Aktivität (E/mg)	Ges. Aktivität (E)
3	8,0	40	0,020	0,8
4	15,4	77	0,078	6,0
5	16,7	83,5	0,113	9,4
6	23,2	116,0	0,171	19,8
7	33,5	167,5	0,072	12,1
8	36,2	181,0	0,038	6,9

12 g Zellen von Rps. gelatinosa wurden in 30 ml 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2 suspendiert und anschließend in 5 ml Portionen aufgeteilt. Diese wurden über den angegebenen Zeitraum beschallt. Detaillierte Angaben zur Ultraschallbehandlung, Proteinbestimmung und Aktivitätsbestimmung siehe "Methoden" (4.; 5.; 7.). CL-Aktivität wurde nach Aktivierung mit 1,75 mM Acetanhydrid gemessen.

2.3. Reaktivierung und Bestimmung der Citrat-Lyase-Aktivität sowie Analyse der Reaktionsprodukte

Die Bruttogleichung für die Citrat-Lyase-Reaktion ist seit langem bekannt (DAGLEY, 1954); die Spaltprodukte waren bereits von DEFFNER und FRANKE (1939) durch Gärungsanalysen nachgewiesen worden.

(1) Citrat $\xrightleftharpoons{CL,\ Me^{2+}}$ Acetat + Oxalacetat

(2)


⊗ Nomenklatur der C-Atome des Citrats nach ROSE und O'CONNEL (1967)

Bei dieser reversiblen Spaltung, die außer zweiwertigen Metallionen keine weiteren Cofaktoren benötigt, liegt das Gleichgewicht weit auf Seiten der Reaktionsprodukte. Die Gleichgewichtskonstante beträgt

$$\left[Citrat^{3\ominus}\right] \times \left[Acetat^{1\ominus}\right]^{-1} \times \left[Oxalacetat^{2\ominus}\right]^{-1} = 3$$

(TATE und DATTA, 1965).

Es ist bekannt, daß Coenzym A, das aus der Biosynthese des Citrats nicht wegzudenken ist, beim Abbau desselben durch Citrat-Lyase aus Mikroorganismen keine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu benötigt ATP-Citrat-Lyase (ATP-Citrat-Oxalacetat-Lyase; CoA-acetylierend und ATP-dephosphorylierend; E.C.4.1.3.8) der höheren Organismen zwei Substrate, ATP und CoA. Dieser Unterschied läßt einerseits einen Unterschied im Reaktionsmechanismus beider Enzyme erwarten, wirft aber auch gleichzeitig die Frage nach dem Energiedonator für das Enzym aus Mikroorganismen auf. Die Klärung dieser Frage gelang, wie bereits erwähnt, BUCKEL et al. (1971). Die Autoren bewiesen den Wirkungsmechanismus der Citrat-Lyase anhand des Enzyms aus Klebsiella aerogenes:

(3) Enzym-S-acetyl + Citrat $\rightleftharpoons$ Enzym-S-citroyl + Acetat

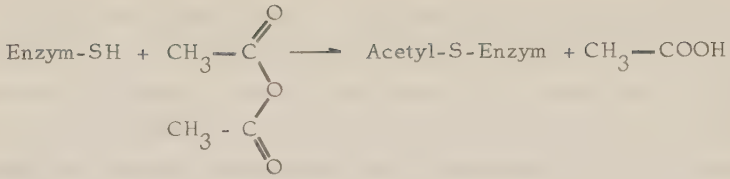
(4) Enzym-S-citroyl $\xrightleftharpoons{}$ Enzym-S-acetyl + Oxalacetat

Die Gesamtreaktion (1) setzt sich aus zwei Teilreaktionen zusammen, dem Austausch der Acyl-Gruppen (3) und der eigentlichen Acyl-Lyase-Reaktion (4). Dieser auf den ersten Blick kompliziert und etwas umständlich anmutende Mechanismus ist in Wirklichkeit biologisch äußerst sinnvoll. Citrat-Lyase besitzt als funktionelle Gruppe den kovalent als Thioester gebundenen Acetylrest; dieser ermöglicht den Ablauf der Gesamtreaktion, indem er seine Energie auf das Substrat überträgt (Citroyl-S-Enzym) und in der Lyase-Reaktion zurückgebracht wird (Acetyl-S-Enzym). Für das Enzym aus Rps. gelatinosa wurde - vorläufig als Arbeitshypothese - angenommen, daß es den gleichen Reaktionsmechanismus befolgt. Dieses Vorgehen schien berechtigt, da ein grundlegender Unterschied zwischen beiden bakteriellen Enzymen nicht zu erwarten war.

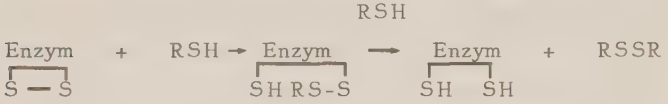
Nachdem das Zellaufschlußverfahren standardisiert worden war, galt es als nächstes, die Bedingungen zu erarbeiten, unter denen die CL-Aktivität im zellfreien Extrakt reproduzierbar gemessen werden konnte. Wie bereits erwähnt, ist aktive CL ein S-acetyl-Protein, das durch Desacetylierung (in-vivo oder rein chemisch in-vitro) in eine inaktive Form übergehen kann (Enzym-SH). Diese konnte zumindest teilweise zur stabileren Disulfid-Form weiterreagieren, da bei der Bereitung des zellfreien Extraktes und im weiteren nicht anaerob gearbeitet wurde. Die Gesamtaktivität an CL im zellfreien System setzte sich also aus drei Teilaktivitäten zusammen, wovon eine meßbar und zwei reaktivierbar waren.

1. Meßbare Aktivität an Acetyl-S-Enzym; der Anteil an der Gesamtaktivität war abhängig von der Wachstumsphase der Zellen, bei ausgewachsenen Kulturen war er nahezu = 0.

2. Inaktives SH-Enzym; es konnte durch Acetylierungsmittel (z. B. Acetanhydrid) zum S-Acetyl-Enzym aktiviert werden.



3. Inaktives S-S-Enzym; es mußte mit einer Thiolverbindung (z. B. 1,4-Dithiothreitol) durch einen Thiol-Disulfid-Austausch (WHITE, 1960; JOCELYN, 1972) zum SH-Enzym reduziert und danach mit Acetanhydrid zum aktiven Acetyl-S-Enzym acetyliert werden.



Im zellfreien Extrakt war eine Konzentration von 2 mM DTE oder DTT völlig ausreichend. Höhere Konzentrationen verschlechterten den Wirkungsgrad der nachfolgenden Acetylierung. Auch bei der Acetylierung der Lyase durfte eine bestimmte Konzentration an Acetanhydrid nicht überschritten werden; da diese nich spezifisch verläuft, bestand die Gefahr einer Schädigung des Enzyms, wie sie von BUCKEL et al. (1971) für die CL aus K. aerogenes und von NAKAMURA (1973) von der L-Asparaginase aus E. coli berichtet wurde. Experimente zur Ermittlung der optimalen Konzentration sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Danach waren 1,75 mM Acetanhydrid eine zur Aktivierung ausreichende Konzentration.

Tab. 5 Bestimmung der optimalen Essigsäureanhydridkonzentration für die Reaktivierung der Citrat-Lyase

Essigsäureanhydrid (mM)	Aktivität der CL (ΔE_{366}/Min.)	*pH-Wert
0	0,02	7,2
0,85	0,05	7,0
1,75	0,12	7,0
3,5	0,075	6,6
7,0	0,02	6,4
8,0	0,015	6,3
21,0	0	6,2

Testansatz s. "Methoden"; vor Zugabe des Substrats wurde 1 Minute mit Acetanhydrid inkubiert. Test bei 30° C mit 30 µl Rohextrakt (≙ 650 µg Protein).

*Der pH-Wert wurde nach Beendigung der Reaktion in der Küvette gemessen.

Im Zusammenhang mit der Reaktivierung der CL durch Ac_2O mag eine prozentuale Angabe der Ausbeute an reaktiviertem Enzym vermißt werden. Dies ist schwierig, da die CL in Rps. gelatinosa nur in einer bestimmten Wachstumsphase vollständig acetyliert vorlag und schon während der Aufarbeitung der Zellen teilweise desacetylierte (Dissertation, GIFFHORN). So war ein vollacetyliertes Vergleichspräparat nur schwer zu erhalten. Nach Untersuchungen von GIFFHORN war die Reaktivierbarkeit der CL mit Acetanhydrid, bezogen auf natives Enzym, größer als 80 %. Im Vergleich dazu war die CL aus K. aerogenes nach BUCKEL et al. (1971) zu 70 % reaktivierbar.

Nach Bestimmung der optimalen Acetanhydridkonzentration, die für eine definierte Menge Enzym bzw. Extrakt galt, blieben noch zwei Fragen ungeklärt:

1. Welche Rolle spielte die Länge der Präinkubation?

2. Bis zu welcher Proteinkonzentration war eine proportionale Acetylierung bei gleichbleibender Anhydridkonzentration erreichbar?

Die entsprechenden Experimente dazu sind in Abb. 1 und 2 zusammengefaßt.

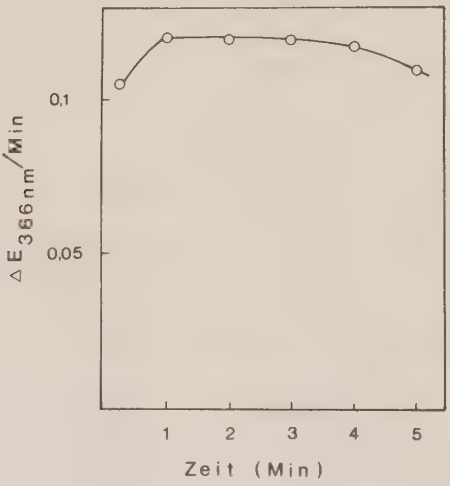


Abb. 1 Acetylierung der Citrat-Lyase mit Acetanhydrid in Abhängigkeit von der Zeit

Testansatz s. "Methoden"; vor dem Start der Reaktion mit dem Substrat wurde mit 1,75 mM (Endkonz.) Acetanhydrid bei 30° C inkubiert. 20 µl Rohextrakt ≙ 520 µg Protein. Der pH-Wert lag nach Beendigung der Reaktion bei allen Ansätzen nicht unter 7,2.

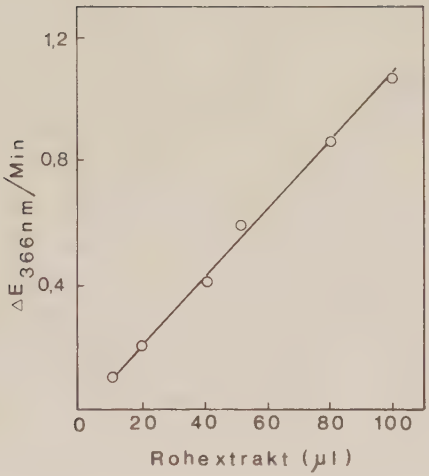


Abb. 2 Acetylierung der Citrat-Lyase in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Rohextrakt.

Testansatz s. "Methoden"; vor Start der Reaktion wurde 1 Minute mit 1,75 mM Acetanhydrid bei 30° C inkubiert. 20 - 100 µl zellfreier Extrakt ≙ 0,165 - 1,660 mg Protein. pH-Wert s. vorige Abb.

Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß die Citrat-Lyase bereits nach einer Minute das Höchstmaß der mit dieser Methode erzielbaren Aktivität erreichte. Rein theoretisch sollte eine vollständige Acetylierung noch schneller erreicht werden, da die Halbwertszeit des Acetanhydrids unter ähnlichen Versuchsbedingungen nur etwa 5 Sek. betrug (BUCKEL et al., 1971). Die Erklärung für die Aktivitätsabnahme nach etwa 4 Minuten war daher weniger in einer Schädigung des Enzyms durch Überacetylierung als in einem Verlust des aktiven Acetylrestes durch Acetylaustausch zu suchen. Die eingesetzte Menge Acetanhydrid (1,75 mM) erbrachte für einen relativ breiten Bereich an Protein (0,16 - 1,7 mg Protein im Testansatz) eine proportionale Acetylierung (Abb. 2). Außerhalb dieses Bereiches, sowohl darunter als auch darüber, waren aber eine Senkung bzw. Erhöhung der Acetanhydridkonzentra-

tion erforderlich.

Alle bisher beschriebenen Aktivitätsbestimmungen der CL wurden im gekoppelten optischen Test bei 366 nm durchgeführt (a). Aus der Literatur waren noch zwei weitere Bestimmungsmethoden bekannt, wovon eine ebenfalls zur Bestimmung der Aktivität (b) und die andere zum Nachweis der Reaktionsprodukte geeignet war (c) (Testansätze siehe "Methoden").

a) Im gekoppelten optischen Test mit $NADH_2$ als Meßgröße (λ = 366 nm) wird die Reduktion des entstehenden Oxalacetats zu Malat durch Malat-DH verfolgt (Boehringer Biochemica Information).

b) Im UV-Test wird die Anhäufung des Enol-Oxalacetats durch Absorption der Doppelbindung bei λ = 280 nm gemessen. Dieser Test kann nur zur Bestimmung der spezifischen Aktivität herangezogen werden, wenn das Enzympräparat Decarboxylase-frei ist (GRUNBERG-MANAGO, 1953).

c) Im Isotopentest mit ^{14}C-markiertem Citrat zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Verbindungen.

Der molare Extinktionskoeffizient ist für Enol-Oxalacetat bei 280 nm = 3 600 cm^2/Mol (TATE et al., 1964) bzw. 450 cm^2/Mol nach WHEAT und AJL (1955) und für $NADH_2$ bei 366 nm $3{,}3 \times 10^6$ cm^2/Mol (Boehringer Testvorschrift, 1971). Die Testmethode (b) war weniger interessant bezüglich ihrer Eignung als Standardtest, als wegen der charakteristischen Reaktionskinetik. In Abb. 3 wurden die Reaktionskinetiken der CL aufgenommen nach den Methoden a (A - D) und b (E) und miteinander verglichen.

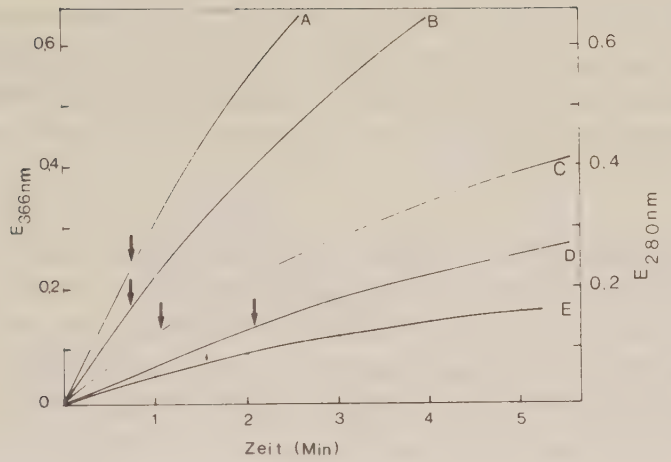


Abb. 3 Reaktionskinetik der Citrat-Lyase aus Rhodopseudomonas gelatinosa

Testansätze s. "Methoden"; vor Start der Reaktion wurde in der Meßküvette 1 Minute mit 1,75 mM Acetanhydrid bei 30° C inkubiert. Der Proteingehalt der einzelnen Ansätze war wie folgt:

A = 50 µl ≙ 1,3 mg
B = 40 µl ≙ 1,040 mg
C = 20 µl ≙ 0,520 mg
C = 10 µl ≙ 0,260 mg
E = 10 µl ≙ 0,260 mg

Durch Pfeile (↓) wurde markiert, wie lange der Verlauf der Kinetik geradlinig ist.

Für die Bestimmung von spezifischen Aktivitäten erwies sich die modifizierte Form von Test (a) als geeignetste Methode (Kinetik!). Entscheidend war, daß in diesem Testverfahren kein Oxalacetat während der enzymatischen Reaktion angehäuft wurde; die Bestimmungen waren gut reproduzierbar. Die Testmethode (b) beruhte auf der Anhäufung von Oxalacetat. Die dadurch bedingte Absorption bei 230 nm ist jedoch nicht nur von der Konzentration des Oxalacetats, sondern auch von der bestimmter Metallionen (Mn^{++}, Mg^{++}) abhängig (WHEAT und AJL, 1955), was eine exakte Kontrolle der Konzentration dieser Ionen verlangt. Bei Betrachtung der Reaktionskinetiken fällt auf,

daß die Kurven nach relativ kurzer Zeit (0,5 - 2 Min.) bereits abknicken, bei E ist fast keine Linearität erkennbar. Dies ist nicht etwa auf eine Begrenzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Substratmangel zurückzuführen, vielmehr äußert sich hierin eine Eigenschaft des Enzyms (Reaktionsinaktivierung), die in Abschnitt 4.1.2. näher beschrieben wird.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels soll ein Experiment beschrieben werden, mit dem die Produkte der Citratspaltung nachgewiesen wurden (c). Da in diesem Experiment 1,5^{14}C-Citrat durch zellfreie Extrakte und nicht durch das reine Enzym von Rps. gelatinosa gespalten wurde, waren außer den Reaktionsprodukten der CL-Reaktion auch Folgeprodukte nachweisbar. Die Ergebnisse wurden in Tab. 6 zusammengestellt.

Tab. 6 Bildung radioaktiv markierter Verbindungen aus 1,5^{14}C-Citrat durch zellfreie Extrakte von Rhodopseudomonas gelatinosa

Markierte Verbindung	Radioaktivität Imp./Min.	Radioaktivität %
$C^{14}O_2$	113 166	13,2
C^{14}-Acetat	228 060	26,7
C^{14}-Malat	33 450	3,9
C^{14}-Aspartat	2 059	0,2
C^{14}-Lactat	1 050	0,1
C^{14}-Citrat*	2 006	0,2

Eingesetzte Radioaktivität: 853 900 Imp./Min.

Nach Beendigung des Experiments: 709 120 Imp./Min. ≙ 100 %

Radioaktivität in markierten Verbindungen (Σ): 379 791 Imp./Min. ≙ 44,3 %

*Nicht umgesetztes Citrat

Die Tabelle zeigt das für Spaltung durch Citrat-Lyase typische Spektrum an markierten Verbindungen und ist in guter Übereinstimmung mit entsprechenden in-vivo Untersuchungen (SCHAAB et al., 1972). Die Entstehung der markierten Verbindungen wurde in der Einleitung (Schema 1) skizziert.

3. Anreicherung der Citrat-Lyase

CL wurde aus zellfreien Extrakten frisch geernteter Zellen angereichert (s. "Methoden"). Das dabei für dieses Enzym ausgearbeitete Verfahren weicht von den bisher in der Literatur beschriebenen ab (DAGLEY und DAWES, 1955; WHEAT und AJL, 1955). Zum Teil erfolgte dies gezwungenermaßen, weil einige der "klassischen" Anreicherungsschritte wie Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Säurefällung und Hitzeschritt wegen der zu hohen Verlustraten nicht angewendet werden konnte. Die Anreicherung wurde in Phosphat-Puffer durchgeführt, da organische Puffer die Aktivität der CL herabsetzten und die Acetylierung des Enzyms erschwerten. Einen Überblick sollen an dieser Stelle (detaillierte Angaben s. "Methoden" 9.) ein Präparationsschema und die Anreicherungstabelle geben, welche repräsentativ für zehn Anreicherungen ist.

Das Experiment wurde unter N_2-Atmosphäre bei 30° C im Warburggefäß durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 60 Min. mit 0,1 ml 3 N HCl abgestoppt, Protein 3 Min. hitzedenaturiert und abzentrifugiert. Radioaktives $C^{14}O_2$ wurde mit 0,2 ml Hyamin-OH - auf Filterpapierfächer im Zentralzylinder - aufgefangen. Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 3 ml: TEA-HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,6; $MgCl_2$, 0,5 mM; $NADH_2$, 0,2 mM; 1,5-C^{14}-Citrat spez. Radioaktivität, 426 950 Imp./Min./µMol; MDH und LDH je 20 µg; sowie 0,4 ml (13,4 mg Protein) zellfreien Extrakt mit nativer Citrat-Lyase-Aktivität (15^h-Zellen). Spez. Aktivität 0,171 µMole/Min./mg. Zusätze von ATP und CoA (je 1 mM) ergaben keine Veränderung der markierten Reaktionsprodukte. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und Isolierung der markierten Verbindungen wurde nach dem von BEUSCHER und GOTTSCHALK (1972) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Feuchte Zellen in 75 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ + 1 mM DTE

↓

1 Passage French-Presse; Zentrifugation; 30 Min. bei 20 000 x g

↓

Überstand konzentrieren; TCF 10-Kammer; Membran XM-300 000

↓

1. Zentrifugation: 180 Min. bei 100 000 x g; Überstand aufbewahren, Pellet in obigem Puffer aufnehmen

↓

2. Zentrifugation: 180 Min. bei 100 000 x g; Überstand mit dem der 1. Zentrifugation vereinigen

↓

Überstände konzentrieren; Amicon TCF 10 Gerät; Membran XM-300 000

↓

Protaminsulfatfällung: 0,1 ml einer 2 %igen Protaminsulfatlösung pro ml Extrakt. Zentrifugation: 30 Min. bei 20 000 x g

↓

Überstand an DEAE-Zellulose DE 52 chromatographieren

↓

Aktive Fraktionen konzentrieren; UF-Zelle; Membran XM-300 000

↓

1. Gelfiltration mit Sepharose 6 B

↓

Aktive Fraktionen konzentrieren; UF-Zelle; Membran XM-100 000

↓

2. Gelfiltration mit Sepharose 6 B

↘

Reines Enzympräparat

Schema 2 Anreicherung der Citrat-Lyase aus Rhodopseudomonas gelatinosa

Tab. 7 Anreicherung der Citrat-Lyase aus Rhodopseudomonas gelatinosa

Anreicherungsschritt	Vol. (ml)	Ges. Protein (mg)	Spez. Aktivität (E/mg)	Ges. Aktivität (E)	Ausbeute (%)	Anreicherungs-faktor
Zellfreier Extrakt	850	10 972	3,21	35 220	100	1
Überstände 2 x 100 000 x g	790	2 765	12,9	35 668	101,2	4,0
Konzentrat XM-300 000	240	1 920	15,5	29 760	84,4	4,8
Überstand Protaminsulfat	270	1 350	21,8	29 430	83,5	6,8
DEAE-Zellulose Fr. 415 - 435	150	321	43,1	13 828	39,2	13,4
Sepharose 6 B Fr. 240 - 266	46	39,1	70,7	2 764	7,8	22,1
Sepharose 6 B Fr. 43 - 52	16	16,8	138,8	2 331	6,6	43,3

3.1. Reinigung des Rohextraktes durch Ultrafiltration und Zentrifugation

Für die ersten Anreicherungsschritte wurden physikalische Methoden eingesetzt, die den Rohextrakt nach dem Molekulargewicht der Proteine fraktionierten. Es wurden Moleküle mit einem Molekulargewicht < 300 000 D durch Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen mit dieser Ausschlußgrenze abgetrennt, hochmolekulare Strukturen (Chromatophoren, Membranreste) wurden durch Zentrifugation bei 100 000 x g sedimentiert.

3.2. Ionenaustauscher - Säulenchromatographie

Am Ende dieser Anreicherung sollte ein von Fremdprotein freies Enzympräparat stehen, deshalb hatte beim Vereinigen der gesammelten Chromatographie-Fraktionen der Reinheitsaspekt stets Priorität gegenüber dem einer guten Ausbeute. Bei der DEAE-Zellulose-Chromatographie wurde zunächst nicht adsorbiertes oder locker adsorbiertes Protein mit 75 mM PO_4-Puffer, pH 7,2 von der Säule gewaschen, dann wurde durch Erhöhung der Pufferkonzentration und durch KCl-Zusatz am Austauscher gebundenes Protein eluiert. Die Spitze des Aktivitätspeaks der CL folgte immer etwa 5 Fraktionen nach dem Proteinmaximum, hierdurch konnte ein großer Teil Fremdprotein weggeschnitten werden. Im Durchschnitt (aus acht Anreicherungen ermittelt) erbrachte dieser Chromatographieschritt einen Anreicherungsfaktor von zwei und reduzierte den Gesamtproteingehalt um 70 %. Mit anderen Ionenaustauschern (Sephadex A-50 und Neocel) waren die Verlustraten zu hoch, so daß diese Schritte nicht zur Anwendung kamen. In Abb. 4 ist das typische Elutionsprofil einer DEAE-Zellulose-Chromatographie dargestellt.

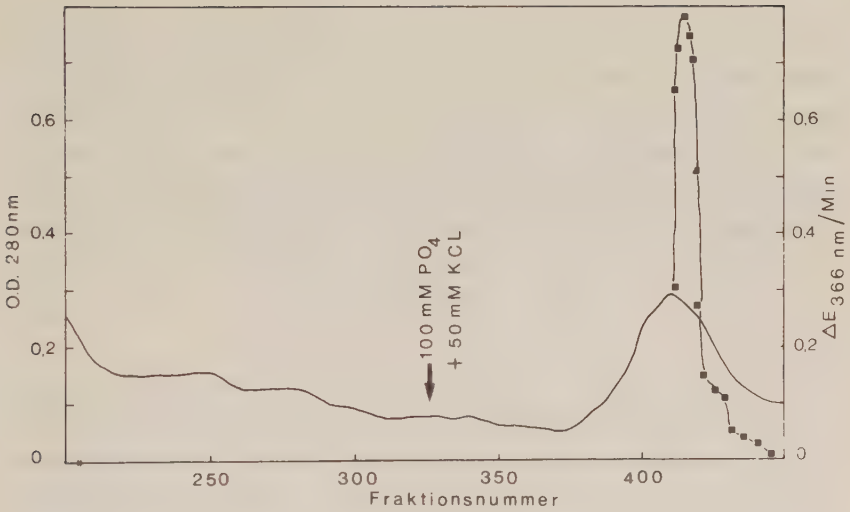


Abb. 4 DEAE-Zellulose-Säulenchromatographie

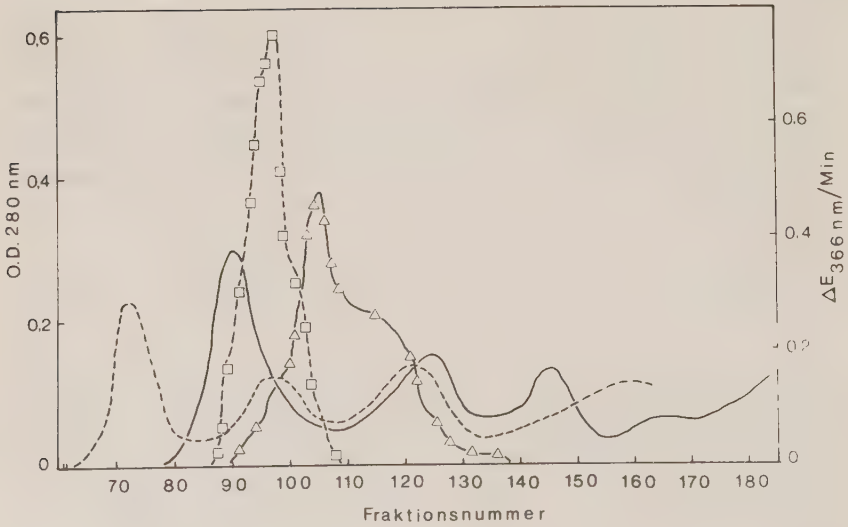
Das bei einer Ionenstärke von 75 mM (Phosphat-Puffer, pH 7,2) adsorbierte Protein wurde durch Erhöhung der Ionenstärke (100 mM Phosphat-Puffer, pH 7,2 + 50 mM KCl) eluiert. Ohne Zusatz von KCl erschien kein scharfer Aktivitätspeak, sondern eine langgezogene Zone mit geringerer Citrat-Lyase-Aktivität. Die Durchflußgeschwindigkeit lag im Mittel bei 15 Fraktionen/Std.; das Volumen der Fraktionen betrug im Durchschnitt 6 ml. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 5 µl pro Fraktion entnommen, wie beschrieben reaktiviert und bei 366 nm getestet. ■-■ = Enzymaktivität.

3.3. Gelfiltration und Analyse des gereinigten Enzympräparates

Im weiteren wurde nun nicht mehr nach Ladungszustand der Proteine, sondern nach deren Molekülgröße aufgetrennt. Im Bereich der Chromatographie ist die Methode der Wahl hierfür eine Gelfiltration. Für die CL aus K. aerogenes (MAHADIK und SIVA RAMAN, 1968) war ein Molekulargewicht von 575 000 ermittelt worden; von dem Enzym aus Rps. gelatinosa war durch sein Ultrafiltrationsverhalten bekannt, daß das Molekulargewicht weit über 300 000 liegen mußte.

Auf Grund der Selektivitätskurven für Proteine (Informationsschrift der

Firma Pharmacia) wäre für die Anreicherung der CL Sephadex G-200 geeignet, da es eine gute Trennung bis zu einem Molekulargewichtsbereich von 600 000 ermöglicht. Da Sepharose 6 B, ein perlförmiges Agarosegel, im oberen Trennbereich von Sephadex G-200 ebenfalls verwendet werden kann, wurden beide Geltypen in einem Experiment verglichen (Abb. 5).



Betrachtete man zunächst in Abb. 5 nur die Proteinprofile beider Läufe, so wurde deutlich, daß diese zwar etwas phasenversetzt aber vom Verlauf her sehr ähnlich waren. Der Unterschied zwischen beiden Geltypen lag im Bereich hoher Molekulargewichte und wurde bei einem Vergleich der Aktivitätspeaks erkennbar. Bei dem Sepharose 6 B-Lauf lagen zwischen Maximum des Ausschlußvolumens und dem des Aktivitätspeaks 25 Fraktionen, der Peak war schmal (20 Fraktionen) und korrespondierte mit dem Proteinpeak.

Aus dem Elutionsprofil des G-200 Laufes war zu ersehen, daß zwischen beiden Maxima nur 15 Fraktionen lagen, daß der Aktivitätspeak breit auseinander gezogen war (ungefähr 40 Fraktionen) und daß er mit zwei Proteinpeaks überlappte. Daraus wurde geschlossen, daß für dieses spezielle Trennproblem ein Gel vom Typ der Sepharose 6 B eher in Frage kam. Weitere Vorteile der Sepharose Gele waren eine bessere mechanische Stabilität und eine höhere Durchflußrate. Diese Eigenschaften waren ebenfalls nicht zu unterschätzen, da pro Anreicherung im 1. Sepharose-Lauf (Hauptreinigungsschritt) eine beachtliche Menge an Protein (280 - 350 mg) aufgetragen wurden, ohne daß dies die Laufgeschwindigkeit negativ beeinträchtigte. Zur vollständigen Reinigung von Fremdprotein waren zwei Sepharose-Läufe mit Säulen unterschiedlicher Dimensionen notwendig (s. Abb. 6 und Abb. 7).

Abb. 5 Vergleich der Effektivität von Sephadex G-200 und Sepharose 6 B für die Anreicherung der Citrat-Lyase

Zwei Chromatographierohre (26 mm Ø; 90 cm Füllhöhe) wurden mit äquilibrierten Gelen (Sephadex G-200 Superfine bzw. Sepharose 6 B) gefüllt. Beide Säulen wurden mit 8 ml konzentrierter Proteinlösung (je 80 mg) überschichtet; die Trennung wurde unter konstantem Druck (Mariottsche Flasche mit 100 mM Phosphat-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt.

Durchlaufgeschwindigkeit 6 ml/Std.; Fraktionsvolumen = 1,5 ml.
□--□--□ = Sepharose 6 B, Enzymaktivität ; △—△—△ Sephadex G-200

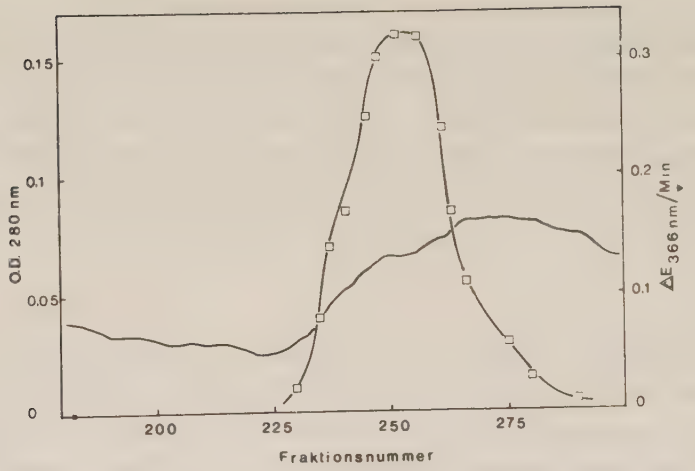


Abb. 6 Gelfiltration an Sepharose 6 B (1. Lauf)

Zwei Chromatographierohre (26 mm Ø; 60 cm Gelbettlänge und 25 mm Ø; 90 cm Gelbettlänge) wurden mit äquilibrierter Sepharose 6 B (100 mM PO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$) beschickt und miteinander verbunden. In diesem System wurden 10 - 15 ml konzentrierter Proteinlösung (Proteingehalt bis zu 22 mg/ml) in auf- und absteigender Chromatographie nach Molekülgröße separiert. Durchflußrate 9 ml/Std.; Fraktionsvolumen 26 Tropfen ≙ 1,5 ml. Für die Aktivitätsbestimmung wurden jeder Fraktion 5 µl Enzymlösung entnommen, in der Test-Küvette reaktiviert und bei 366 nm getestet. □—□ = Enzymaktivität

Für eine vollständige Reinigung des Enzyms bot sich nach den guten Trennergebnissen des 1. Sepharose-Laufes eine nochmalige Chromatographie mit dem gleichen Gel an. Abb. 7 zeigt für den Bereich enzymatischer Aktivität im Absorptionsprofil bei 280 nm einen homogenen Proteinpeak und einen Peak von abgetrenntem Fremdprotein mit einem Anteil am Gesamtprotein von etwa 10 %. Der Aktivitätspeak war gegenüber dem Proteinpeak häufig um 1 Fraktion versetzt, eine Erklärung dieses Effektes durch Beteiligung von Fremdprotein konnte aber ausgeschlossen werden, denn Abb. 9 zeigt in der Plattenelektrophorese (Bahn 1 und 6) für ein solches Enzympräparat eine homogene Bande. Wurde Sepharose 6 B durch G-200, Bio-Gel-A 1,5 m

oder Sepharose 4 B ersetzt, waren keine vergleichbar reinen Enzympräparate erzielbar.

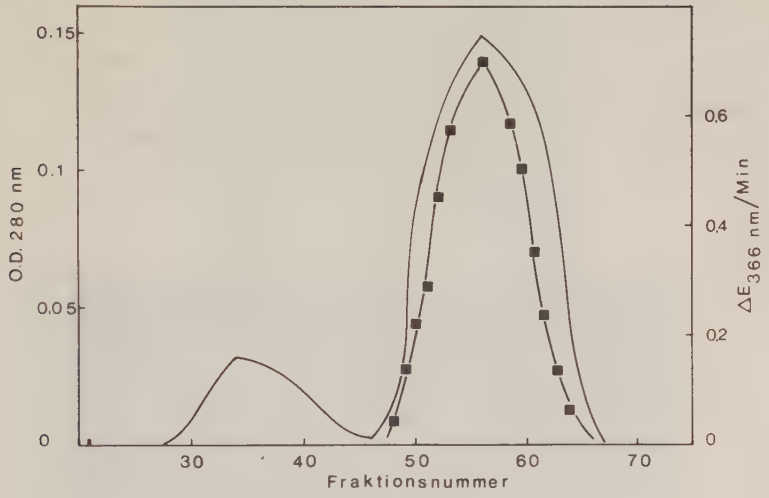


Abb. 7 Gelfiltration an Sepharose 6 B (2. Lauf)

Die Sepharose 6 B-Säule (15 mm Ø; 80 cm Füllhöhe) war gegen 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ äquilibriert. 3 ml konzentrierter Proteinlösung (40 mg Protein) wurden aufgetragen und mit geringer Durchflußrate (5 ml/Std.) chromatographiert (Dauer 18 Std.). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit 5 µl reaktiviertem Enzym je Fraktion, wie beschrieben. ■—■ = Enzymaktivität.

Der beschriebene Anreicherungsgang erbrachte ein 43fach angereichertes Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 139 E/mg. Die recht niedrige Ausbeute von 6,6 % ist wohl vor allem durch die Labilität des Enzyms bedingt, diese war noch zusätzlich erhöht, weil es als SH-Enzym angereichert wurde. Zur routinemäßigen Kontrolle des Reinheitsgrades der angereicherten CL wurde die analytische Polyacrylamid-Elektrophorese verwendet. Andere Reinheitskriterien (Elektronenmikroskopie, analytische Ultrazentri-

fuge) wurden im Zusammenhang mit der Bestimmung des Molekulargewichtes herangezogen und werden im Abschnitt 4.2. behandelt. Hier soll lediglich gezeigt werden, wie effektiv die Sepharose-Chromatographie für die Reinigung des Enzym war (Abb. 8). Nur bei der größten Proteinmenge (60 µg) wurden neben der Enzymbande noch diffuse "shadows" erkannt. In Abb. 9 (Bahn 1 und 6) waren nach zweimaliger Sepharose-Chromatographie auch nicht mehr die geringsten Spuren von Fremdprotein erkennbar.

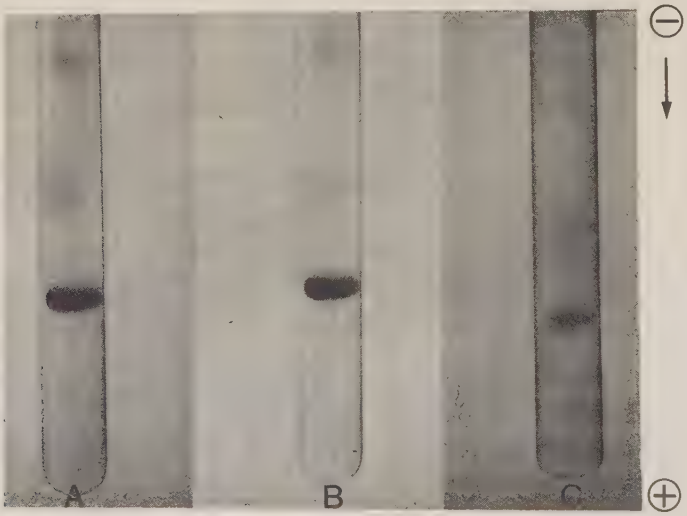


Abb. 8 Disk-Elektrophorese der Citrat-Lyase nach dem ersten Sepharose-Lauf

A = 60 µg Protein; B = 40 µg Protein; C = 20 µg Protein;
Durchführung und Trennsystem der Elektrophorese (s. "Methoden" 11.3. bzw. 11.2. D).

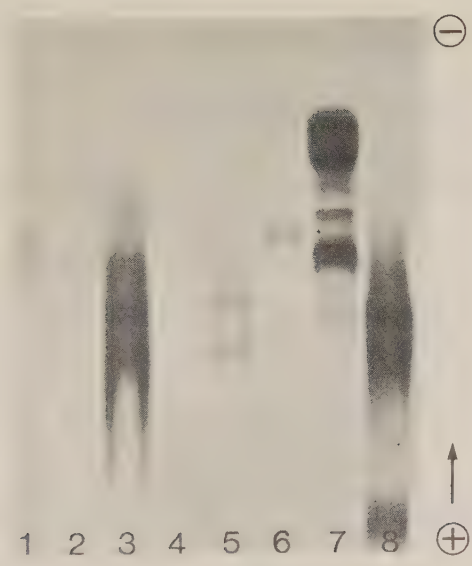


Abb. 9 Kontinuierliche Elektrophorese von Proteinproben aus verschiedenen Anreicherungsschritten

Nr.
1 30 µg Protein; Enzym nach 2. Sepharose-Lauf
2 5 µg Protein; zellfreier Extrakt nach Protaminsulfatfällung
3 80 µg Protein; Überstand nach 100 000 x g Zentrifugation
4 — keine Proteinanfärbung
5 30 µg Protein; vereinigte Fraktionen der DEAE-Zellulose-Chromatographie
6 50 µg Protein; Enzym nach 2. Sepharose-Lauf
7 100 µg Protein; Citrat-Lyase aus K. aerogenes (Boehringer Präparat)
8 80 µg Protein; zellfreier Extrakt

Trennsystem und Durchführung der Elektrophorese (s. "Methoden" 11.2. D bzw. 11.3.).

Laufzeit der Elektrophorese 6 Std.; bei 15 mA und 130 Volt.

4. Charakterisierung der Citrat-Lyase

4.1. Kinetische Eigenschaften der Citrat-Lyase

4.1.1. Optimierung der Reaktivierungs- und Testmethoden

Ein Problem, das bereits für das Enzym im zellfreien Extrakt beschrieben wurde (s. 2.3.), trat noch in stärkerem Maße während der Anreicherung auf. Gemeint ist die Inaktivierung der CL durch Oxidation essentieller SH-Gruppen zu Disulfid-Brücken. Diese Inaktivierung nahm mit der Verdünnung der Proteinlösung zu, so daß insbesondere für die angereicherten Enzympräparate, deren Proteingehalt sehr niedrig war, optimale Bedingungen für die Reaktivierung ausgearbeitet werden mußten. Der Prozeß der Reaktivierung zum SH-Enzym wurde bereits als Thiol-Disulfid-Austausch beschrieben (2.3.). Dieser wird durch Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Inkubationszeit und Konzentration des Thiols beeinflußt (GALL et al., 1968). Im Fall der CL kam es wegen der Acetylierung, die der Reaktivierung zum SH-Enzym unmittelbar folgte, darauf an, mit möglichst niedrigen Thiolkonzentrationen zu arbeiten. Deshalb wurden auf Grund ihres niedrigen Redoxpotentials (-0,33 V bei pH 7,0) und geringer Autoxidationsrate die am besten geeigneten Dithiole DTE und DTT (erythro- und threo Isomer des 2,3 dihydroxy-1,4-dithiolbutan) verwendet. In Abb. 10 wurde der Einfluß der Reaktivierungsdauer, bei verschiedenen Thiolkonzentrationen, auf die erzielbare Menge an enzymatisch aktiver CL dargestellt.

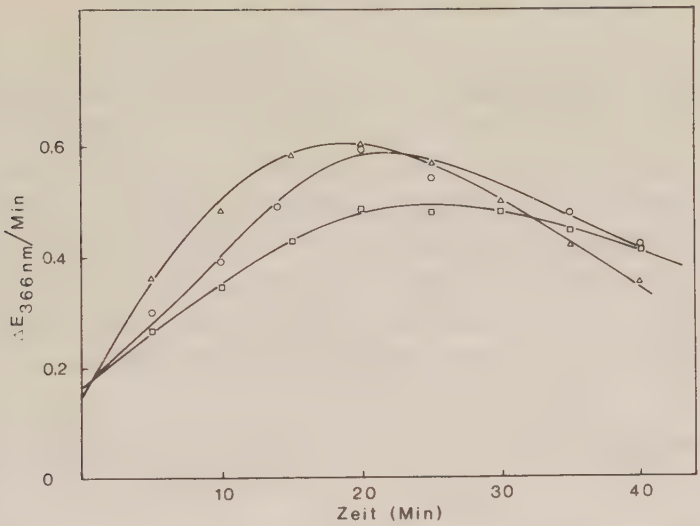


Abb. 10 Reaktivierung der Citrat-Lyase durch Dithiothreitol in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration

1 ml gereinigte Citrat-Lyase (1,3 mg Prot./ml; spez. Aktivität (-) DTT = 14,2 E/mg) wurde mit 2; 3 bzw. 5 mM DTT in einem Wasserbad bei 30° C in verschlossenen Präparategläsern inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 10 µl Proben (≙ 13,0 µg Protein) entnommen und in der Testküvette wie beschrieben acetyliert, danach wurde bei 366 nm getestet.

Zeichenerklärung: □–□–□ = 2, O–O–O = 3, Δ–Δ–Δ = 5 } mM DTT

Als Ergebnis der in Abbildung 10 dargestellten Experimente wurden die Bedingungen für die Reaktivierung der angereicherten bzw. längere Zeit aufbewahrten Enzympräparate standardisiert. Die Proteinlösungen wurden mit 3 mM DTT oder DTE zwanzig Minuten bei 30° C inkubiert. Dieses Verfahren stellte einen Kompromiß zwischen maximaler Reaktivierung zum Enzym-SH und minimalem Thiol-Überschuß dar. War zuviel R-SH in der Enzymlösung vorhanden, so erschwerte es nicht nur die Acetylierung, sondern begünstigte auch eine Transacetylierung, vom Enzym auf das Thiol (Abb. 11).

Für bestimmte Experimente (s. 4.4.2.) mußte überschüssiges DTT nach Reaktivierung und Acetylierung durch Sephadex G-25 Chromatographie aus der Enzymlösung entfernt werden. Andere gebräuchliche Thiole wie Cystein, Glutathion und 2-Mercaptoäthanol wurden nicht für die Reaktivierung eingesetzt, da sie für vergleichbare Resultate in höherer Konzentration hätten verwendet werden müssen. Hinzu kommt eine wesentlich größere Autoxidationsrate dieser Verbindungen und eine ungünstigere Gleichgewichtskonstante für den Thiol-Disulfid-Austausch (CLELAND, 1963).

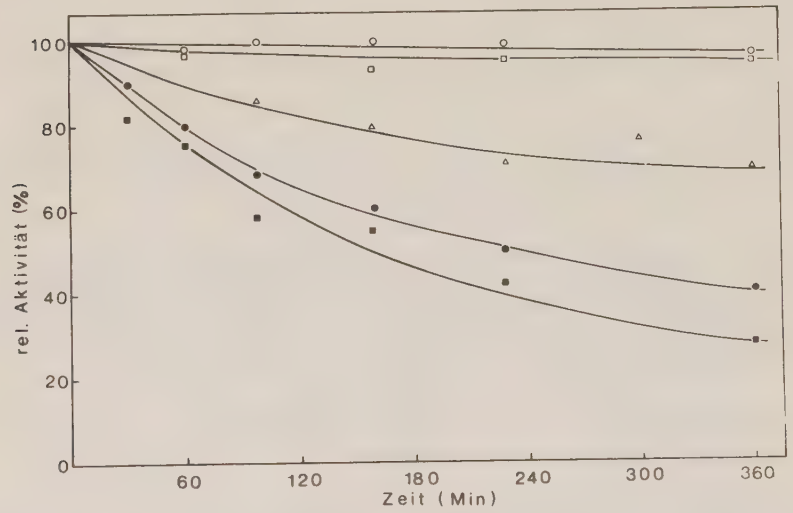


Abb. 11 Inaktivierung der Citrat-Lyase durch Transacetylierung in Gegenwart von SH-Verbindungen

0,2 ml acetyliertes Enzym (≙ 200 µg Protein) wurden mit 0,3 ml KPO_4-Puffer, pH 7,2 und der jeweiligen SH-Verbindung bei 30° C in einem verschlossenen Röhrchen inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 40 µl Proben entnommen und die Aktivität des Enzyms bei 366 nm getestet.

Zeichenerklärung:

○-○-○ = 2 mM N-Acetylcysteamin
□-□-□ = 2 mM DTT
△-△-△ = 5 mM DTT
●-●-● = 10 mM DTT
■-■-■ = 10 mM 2-Mercaptoäthanol

Eine Kontrolle ohne SH-Reagenzien wurde ebenfalls bei 30° C inkubiert; ihr Kurvenverlauf war mit denen für 2 mM SH-Reagenz identisch.

Abbildung 11 zeigt, daß bei hoher SH-Reagenzkonzentration die CL ihren aktiven Acetylrest verlor, wobei freie SH-Gruppen als Acceptoren fungierten. Gleiches wurde auch für die CL aus K. aerogenes von SRERE (1971) beschrieben. Analoge Transacetylierungen sind auch von anderen Thioestern bekannt. Beispiele hierfür sind: Das S-Acyl-Derivat der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als Donator und Glutathion (GSH) als Acceptor (HARTING und VELICK, 1954); Acetyl-Coenzym A als Donator und Dihydroliponsäure als Acceptor (GUNSALUS, 1954) und zwischen Palmityl-Coenzym A und GSH (VIGNAIS und ZABIN, 1958). Die spontane Hydrolyse von Thioestern spielte erst oberhalb von pH 7,0 eine Rolle, stieg dann allerdings mit zunehmend alkalischeren pH-Werten sehr schnell an.

Mit dem in Abb. 11 beschriebenen Experiment sollte kein quantitativer Zusammenhang zwischen Thiolkonzentration und Hydrolyseraten hergestellt werden; es diente lediglich dem Nachweis, daß bei den zur Reaktivierung verwendeten Konzentrationen an SH-Reagenzien die Transacetylierungsrate gering war. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit CoA-SH und GSH als SH-Reagenz erhalten.

Die Acetylierung der CL im zellfreien System ist bereits im Abschnitt 2.3. beschrieben worden. Das angereicherte Enzym wurde auf zwei unterschiedliche Weisen acetyliert:

1. In der bereits erläuterten Weise mit Acetanhydrid in der Testküvette unmittelbar vor dem Start der enzymatischen Reaktion. Diese Methode hatte den Vorteil, daß durch das relativ große Volumen (3 ml) und eine Vielzahl von "puffernden Gruppen" eine Schädigung des Enzyms durch das Acetylierungsmittel nicht beobachtet wurde. Lediglich bei Enzymmengen unter 10 µg pro Testansatz mußte die Acetanhydridkonzentration

von 1,75 mM auf 0,85 mM gesenkt werden. War die eingesetzte Proteinmenge nicht bekannt, wurden zusätzlich Kontrolltests mit halber (0,85 mM) und doppelter (3,5 mM) Menge des Anhydrids durchgeführt.

2. Durch direkte Behandlung der Enzymlösung (häufig 0,5 ml Portionen). Für eine Reihe von Experimenten war es notwendig, von einer bereits acetylierten Enzymlösung auszugehen, da die Acetylierung einer Vielzahl von Ansätzen Schwankungen der jeweiligen Enzymaktivitäten in den Testansätzen mit sich bringen würde. Bei der direkten Acetylierung der Enzymlösung wurde das "mildere" Acetylimidazol (selbstpuffernd) dem Acetanhydrid vorgezogen.

Acetylimidazol lieferte zwar nur 85 % acetyliertes Enzym (Acetanhydrid 92 %) im Vergleich zur Aktivierung in der Küvette, die Acetylierung war dafür aber besser reproduzierbar. Acetylimidazol wurde in einer Endkonzentration von 50 mM eingesetzt; nach 5 Minuten waren dann 500 - 700 µg Enzym maximal acetyliert. Dieses Enzympräparat blieb bei 25° C in Phosphat-Puffer, pH 7,2 aufbewahrt über 8 Std. fast gleichbleibend aktiv. In Tab. 8 ist eine Übersicht sämtlicher verwendeter Acetylierungsmittel und ihrer Wirksamkeit bei Aktivierung in der Küvette gegeben.

Tab. 8 Chemische Aktivierung der Citrat-Lyase aus Rhodopseudomonas gelatinosa

Aktivierungsmittel	Optimale Konzentration (mM)	Max. Aktivität in %
Acetanhydrid	1,75	100
Propionsäureanhydrid	1,3	100
Buttersäureanhydrid	1,0	82
Crotonsäureanhydrid	2,2	41
Valeriansäureanhydrid	1,7	29
Hexansäureanhydrid	2,1	6
1-Acetylimidazol	10	70
Acetyl-Coenzym A*	0,3	10

Vorinkubation 1 Minute in der Meßküvette mit komplettem Ansatz (-) Citrat; Test bei 30° C mit 10 µg Enzym. Die mit Acetanhydrid erzielbare Aktivität wurde = 100 % gesetzt.

* = Vorinkubation 15 Minuten.

Aus diesen Werten war zu ersehen, daß mit zunehmender Kettenlänge der Anhydride die Aktivierungsfähigkeit abnahm. Die Gründe dafür waren neben einer sterischen Hinderung der längerkettigen Anhydride auch in ihrer geringeren Löslichkeit zu suchen.

4.1.2. Experimente zur Inaktivierung der Citrat-Lyase

In Abb. 3 war die Kinetik der CL-Reaktion in zellfreien Extrakten von Rps. gelatinosa dargestellt worden; für das reine Enzym sah sie nicht anders aus. Auffällig war der im Vergleich zu anderen Enzymen kurze geradlinige Verlauf des Substratumsatzes (0,5 - 2 Minuten je nach eingesetzter Enzymmenge). Die Erklärung für diesen abknickenden Verlauf der Kinetik war, daß die CL aus Rps. gelatinosa während des Ablaufs der durch sie katalysierten Reaktion inaktivierte. Dieses Phänomen ist für die Enzyme aus E. coli, K. aerogenes und St. faecalis seit langem bekannt (DAGLEY und DAWES, 1955; WHEAT und AJL, 1955; HARVEY und COLLINS, 1961; BOWEN und ROGERS, 1963; TATE und DATTA, 1964), jedoch lange nicht richtig interpretiert worden. Als mögliche Erklärung für die abnehmende Rate des Substratumsatzes wurde eine Produkthemmung durch Oxalacetat (WHEAT und AJL, 1955), genauer durch die Enol-Form dieser Verbindung (TATE und DATTA, 1964) angenommen. 1971 konnten SINGH und SRERE jedoch zeigen, daß auch mit einem hohen Überschuß (1 000fach, bezogen auf gebildetes Oxalacetat) an "enolischem Oxalacetat" nur eine 50 %ige Hemmung erzielbar war. Das ließ eine Produkthemmung unwahrscheinlich erscheinen. Im gleichen Jahr konnten BUCKEL und EGGERER nachweisen, daß die Inaktivierung durch Oxalacetat mit einer Desacetylierung des Enzyms verbunden war und daß der Verlust des Acetylrestes die Erklärung für die Inaktivierung war. Die CL aus Rps. gelatinosa wurde in Bezug auf diese durch Oxalacetat-Inkubation bedingte Inaktivierung untersucht. Um eine Vergleichsmöglichkeit mit anderen Lyasen zu erhalten, wurden identische Experimente mit CL-Präparaten aus St. diacetilactis und K. aerogenes durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Abb. 12 zusammengestellt.

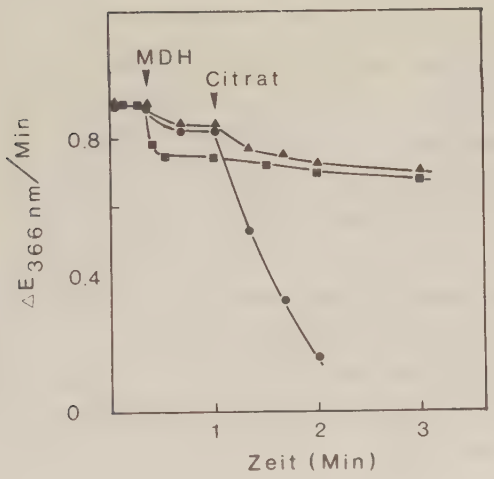


Abb. 12 Einfluß von Oxalacetat auf die Aktivität der Citrat-Lyase verschiedener anaerober Bakterien

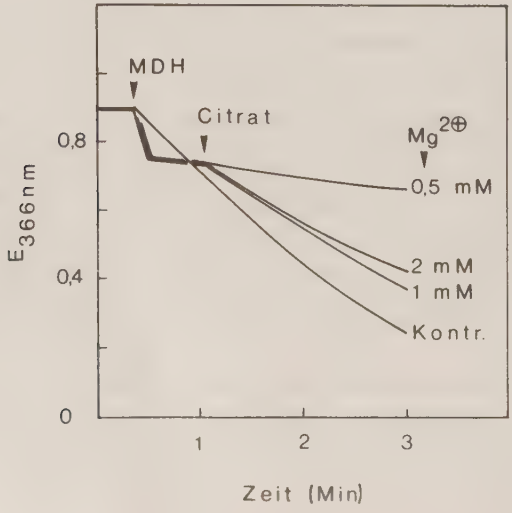
Zeichenerklärung:
●-●-● = St. diacetilactis (1)
▲-▲-▲ = K. aerogenes (2)
■-■-■ = Rps. gelatinosa (3)

Verwendet wurden reine (3) oder zu mehr als 60 % reine Enzympräparate aus den angegebenen Bakterienarten.
2 E Enzym in 0,5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 (50 mM Phosphat-Puffer, pH 7,2) + 0,5 mM Oxalacetat und 0,5 mM $MgCl_2$ wurden 10 Min. bei 20° C inkubiert. Dann wurden in einem normalen 1 ml (3 ml) Testansatz (ohne Citrat und MDH) 0,05 (0,15) ml des obigen Gemisches pipettiert und die Extinktion bei 366 nm gemessen. Anschließend wurde MDH zugesetzt und nach der Reduktion des Oxalacetats die Reaktion mit Citrat gestartet. Bei 1 und 2 war vermutlich ein Teil des Oxalacetats bereits decarboxyliert. Angaben zum Testansatz in Klammern beziehen sich auf Experimente mit Rps. gelatinosa. Der Kurvenverlauf eines Kontrollansatzes ohne Oxalacetat war nahezu identisch mit dem für St. diacetilactis (1).

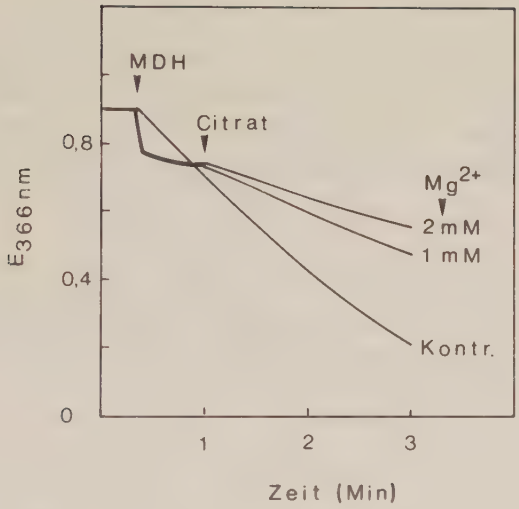
Aus Abb. 12 geht hervor, daß eine Präinkubation mit Oxalacetat nur bei zwei Enzymen (K. aerogenes, Rps. gelatinosa) die Substratumsatz-Geschwindigkeit herabsetzte, während das dritte (St. diacetilactis) unbeein-

flußt blieb. Ebenfalls keine Inaktivierung unter den angegebenen Inkubationsbedingungen zeigte nach Ergebnissen von KÜMMEL (1973) die CL aus L. citrovorum. Eine Erklärung, weshalb sich die Enzyme in diesem Punkt so unterschiedlich verhalten, kann momentan nicht gegeben werden. Gleiches gilt auch weitgehend für den chemischen Mechanismus dieses Phänomens. Der Sachverhalt wird noch weiter kompliziert durch eine Beteiligung von Metallionen, für die ebenfalls eine Erklärung noch aussteht. Nach Untersuchungen von SINGH und SRERE (1971) an der CL aus K.aerogenes ist das Ausmaß der Inaktivierung durch Oxalacetat abhängig von der Art des Metallions (s. 4.1.3.); mehr noch ohne Metallionenzusatz hatte Oxalacetat keinen inaktivierenden Effekt.

In Experimenten mit der CL aus Rps. gelatinosa wurde die Inaktivierung durch Oxalacetat bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen verfolgt, außerdem wurde geprüft, ob die Dauer der Präinkubation einen Einfluß hat. Das Ergebnis zeigen die Abb. 13 und 14.



10 Minuten Präinkubation



20 Minuten Präinkubation

Abb. 13 und 14 Einfluß der Mg^{2+}-Konzentration und der Inkubationsdauer auf die Inaktivierung der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa durch Oxalacetat

Testansatz und Durchführung der Experimente wie in der Legende zu Abb. 12 aufgeführt, lediglich Mg^{2+}-Konzentration und Inkubationszeit wurden wie angegeben variiert. 0,1 ml (≙ 2 E) aktivierte Enzymlösung (spez. Akt. 19,5 E/mg) wurden pro Test eingesetzt. Im Kontrollansatz wurde Citrat zusammen mit MDH zugegeben.

Die Abb. 13 und 14 zeigen, daß Mg^{2+} in 1 mM Endkonzentration die Reaktionsinaktivierung am wenigsten begünstigte. Bei niedrigen (0,5 mM) und höheren Konzentrationen (2 mM) war das Ausmaß der Inaktivierung dagegen größer. Weiterhin war bei einem Vergleich der beiden Abbildungen zu sehen, daß bei längerer Präinkubation, statt 10 Minuten in Abb. 13, 20 Minuten in Abb. 14, auch die Inaktivierung größer war. Nach 190 Minuten Voringkubation war das Enzym vollständig inaktiviert.

Gegenüber dieser durch Oxalacetat bedingten Inaktivierung mußte die Reaktionsinaktivierung durch Citrat etwas abgegrenzt werden. Denn obwohl

beide das gleiche Ergebnis hatten, nämlich eine desacetylierte Lyase, mußten die Wege, auf denen dies erreicht wurde, nicht unbedingt gleich sein. Dafür sprechen die Ergebnisse von BUCKEL et al. (1971), wonach die Inaktivierung der CL durch Oxalacetat als hydrolytische "Entgleisung" zu verstehen ist.

Im folgenden wurde der inaktivierende Einfluß des Citrats auf die CL aus Rps. gelatinosa untersucht. Dabei wurden limitierende Mengen des Substrats (0,1 - 0,2 mM) in Verbindung mit verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen eingesetzt (Abb. 15).

Bei gleicher Citrat-Konzentration und zehn bzw. zwanzigfachem Mg^{2+}-Überschuß (① ②) wurde nach Umsatz von 0,1 mM Citrat ein ΔE von 0,34 bzw. 0,33 erreicht, das entspricht dem theoretischen Wert. Nochmaliger Umsatz von 0,1 mM Citrat erbrachte nur noch ein ΔE von 0,27 bzw. 0,24. Bei äquimolarer Citrat- und Mg^{2+}-Konzentration (⑤ ⑥) waren Reaktionsgeschwindigkeit und Substratumsatz deutlich geringer. Das nach erstmaligem Umsatz von 0,1 mM Citrat erreichte ΔE betrug 0,28; nochmaliger Zusatz von 0,1 mM Citrat oder Mg-Citrat ergab nur ein ΔE von 0,04. Für 0,2 mM Citrat-Umsatz lagen bei äquimolaren Konzentrationen (④) Reaktionsgeschwindigkeit und ΔE ebenfalls unter denen, die mit 10fachem Mg^{2+}-Überschuß (③) erzielt wurden. Als Ergebnis dieser Experimente stand somit fest, daß der Grad der Reaktions-Inaktivierung der CL weitgehend von der Mg^{2+}-Konzentration bestimmt wurde. Diese Abhängigkeit wurde in den nachfolgenden Experimenten eingehender untersucht. Nach dem Umsatz von 0,1 mM Citrat bei verschiedenen Mg^{2+}-Konzentrationen wurde noch einmal die gleiche Menge Substrat zugesetzt. Die dabei auftretende Reaktionsinaktivierung ist aus Abb. 16 zu ersehen.

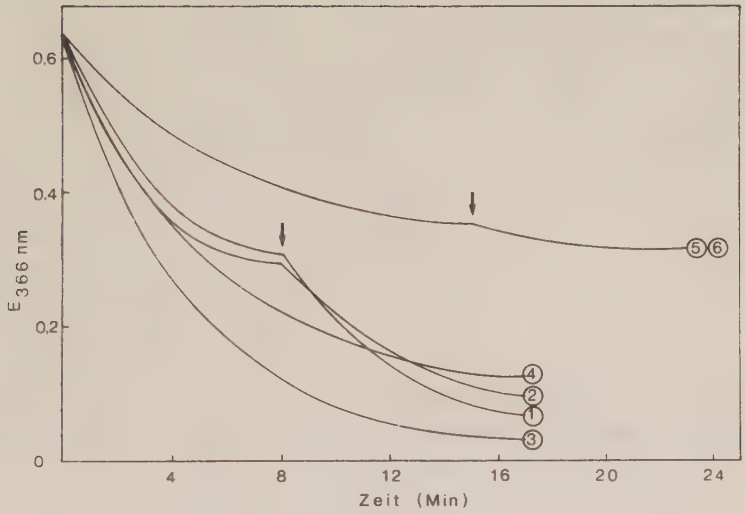


Abb. 15 Reaktionsinaktivierung der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa durch Inkubation mit Citrat

Es wurde in dem unter Abschnitt "Methoden" (7.1. I) mit den für Citrat und Mg^{2+} angegebenen veränderten Konzentrationen, bei 30° C, getestet. 0,1 E aktiviertes Enzym wurde pro Test eingesetzt. Die von 1 - 6 numerierten Ansätze enthielten Citrat und Mg^{2+} in nachfolgenden Konzentrationen; an den mit (↓) markierten Punkten erfolgte erneuter Zusatz einer (Citrat) oder beider Komponenten.

① 0,1 mM Citrat, 2,0 mM Mg^{2+}; (↓) 0,1 mM Citrat
② 0,1 mM Citrat, 1,0 mM Mg^{2+}; (↓) 0,1 mM Citrat
③ 0,2 mM Citrat, 1,0 mM Mg^{2+};
④ 0,2 mM Citrat, 0,2 mM Mg^{2+};
⑤ 0,1 mM Citrat, 0,1 mM Mg^{2+}; (↓) 0,1 mM Citrat
⑥ 0,1 mM Citrat, 0,1 mM Mg^{2+}; (↓) 0,1 mM Mg-Citrat

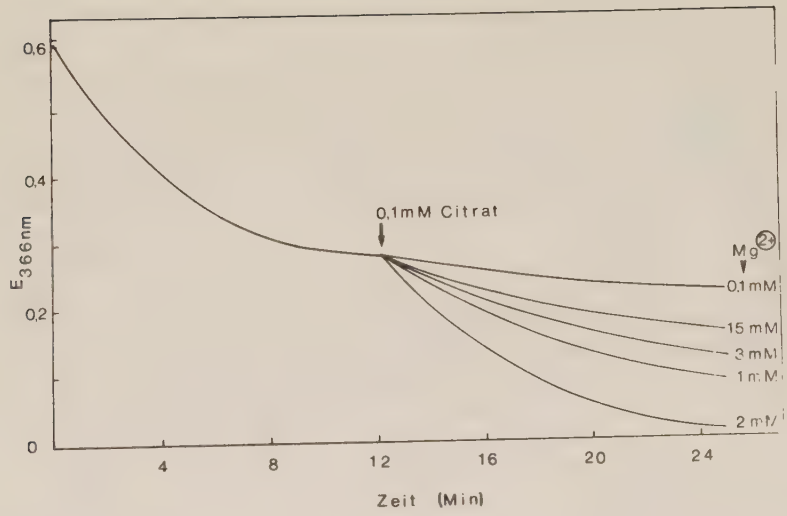


Abb. 16 Reaktionsinaktivierung in Gegenwart unterschiedlicher Mg^{2+}-Konzentrationen

Durchführung und Testansatz siehe Legende zu Abb. 12 und 15.
Von der ersten Citrat-Umsetzung wurde wegen einer besseren Übersicht nur die Kurve mit 2 mM Mg^{2+} gezeichnet.

Bei 2 mM Endkonzentration an Mg^{2+}, innerhalb des Gesamtbereiches von 0,1 - 15 mM, erfolgt maximaler Substratumsatz $\Delta E_{366} = 0,27$ ($\Delta E_{theoret.} = 0,33$) und geringste Reaktionsinaktivierung. Über und unter dieser Konzentration ist der Substratumsatz geringer. Die Erklärung, weshalb bei Mg^{2+}-Konzentrationen > 2 mM der Substratumsatz wieder abnimmt, dürfte nicht in Zusammenhang mit der Reaktionsinaktivierung stehen. Vielmehr liegt es wohl daran, daß zu wenig freies Citrat, Anionen des Citrats bilden Komplexe mit Mg^{2+}-Ionen (WALSER, 1961; TATE und DATTA, 1964), als Substrat zur Verfügung steht.

Bei diesen Experimenten wurde außerdem festgestellt, daß die "Inaktivierungsförderung" verschiedener Ionen unterschiedlich stark war. Während

Mn^{2+}, Mg^{2+} und Co^{2+} in dieser Reihenfolge eine abgestufte Reaktionsinaktivierung erbrachten, war der Substratumsatz in Gegenwart von Zn^{2+} und Ni^{2+} linear (s. 4.1.3.). Diese Beobachtung wurde auch bereits für die CL aus K. aerogenes beschrieben. Nach Untersuchungen von SINGH und SRERE (1971) ist das Ausmaß der Reaktionsinaktivierung dort ebenfalls abgestuft, mit $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+}$.

4.1.3. Metallionenbedürfnis

Auf die Rolle der Metallionen wurde bereits im vorigen Kapitel im Zusammenhang mit der Reaktionsinaktivierung hingewiesen. In diesem Kapitel soll der Einfluß auf die Aktivität des Enzyms beschrieben werden. Für alle bisher aus Mikroorganismen (E. coli, K. aerogenes, St. diacetilactis, L. citrovorum) angereicherten Citrat-Lyasen wurde ein obligates Bedürfnis für zweiwertige Metallionen beschrieben. Ohne zweiwertige Metallionen oder in Gegenwart chelatisierender Agenzien (EDTA) war auch mit der CL aus Rps. gelatinosa keine Aktivität meßbar. In Abb. 17 ist der Einfluß verschiedener zweiwertiger Metallionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Kinetik des Enzyms dargestellt. Die Metallionen wurden in der in Klammern angegebenen optimalen Konzentration eingesetzt.

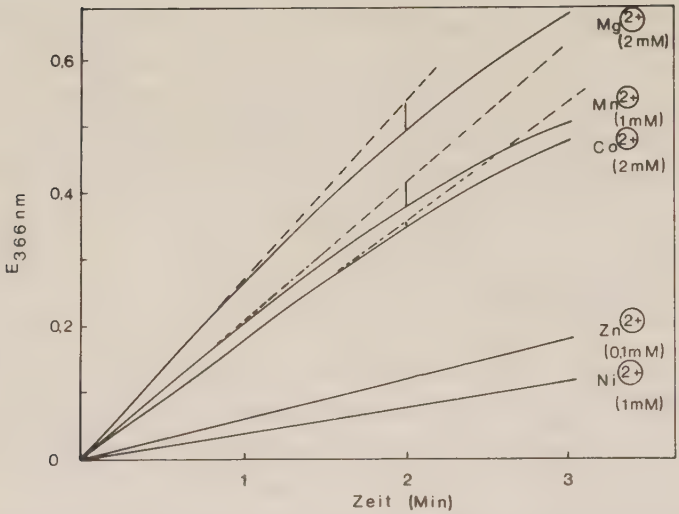


Abb. 17 Aktivität und Kinetik der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Metallionen

Die Aktivität wurde in Abwandlung des in "Methoden" unter 7.1. II angegebenen Testansatzes in 50 mM Triäthanolaminhydrochlorid-NaOH-Puffer, pH 7,4 durchgeführt. Es wurden pro Ansatz 5,5 µg aktiviertes Enzym (spez. Aktivität = 47,3 E/mg) eingesetzt. Die gestrichelten Linien geben den geradlinigen Verlauf des Substratumsatzes an.

Der abknickende Verlauf der Kinetiken mit Mg^{2+}, Mn^{2+} und Co^{2+} war nicht durch Substratmangel, sondern durch die im vorigen Kapitel (4.1.2.) beschriebene Reaktionsinaktivierung zu erklären. Der Substratumsatz mit Zn^{2+} und Ni^{2+} war auch noch weit über den dargestellten Bereich von 3 Minuten hinaus linear. In der folgenden Abb. 18 ist ein Überblick über sämtliche getestete Metallionen und der erzielbaren maximalen Aktivität in Prozent gegeben.

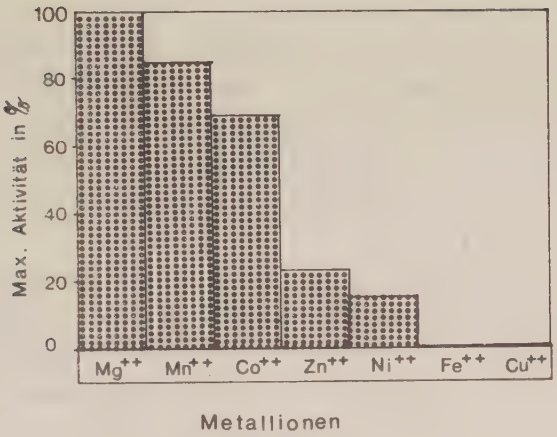


Abb. 18 Einfluß zweiwertiger Metallionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Durchführung und Testansatz siehe Legende zu Abb. 13.
Die mit Mg^{2+} im linearen Umsatzbereich erzielte Geschwindigkeit wurde = 100 % gesetzt. Die Metalle Mg, Mn, Zn, Co, Ni, Cu (0,3 mM), Fe (0,3 mM) und Ca (0,3 mM) wurden als Chloride eingesetzt, Cu und Fe je 0,3 mM außerdem noch als Sulfate. Metallionenkonzentration soweit hier nicht angegeben siehe Abb. 17.

Wie die Abb. 18 zeigt, wurde die Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa sowohl durch Metalle mit kleinem Ionenradius und hoher Ladungsdichte (Mg, Co, Ni - 0,78, 0,82, 0,78 Å) als auch durch größere Kationen (Mn, Zn - 0,91, 0,84 Å) aktiviert.

Der bereits zitierten Arbeit von WARD und SRERE (1964) zufolge gehört die CL zu den Metall-aktivierten Enzymen. Nur binäre Komplexe zwischen Metall und Enzym und keine ternären zwischen Citrat, Metall und Enzym wurden von den Autoren nachgewiesen. Wie diese Aktivierung am Enzym aussieht und ob spezielle binding-sites für das entsprechende Kation vorhanden

sind, wurde bislang nicht geklärt. Von anderen Lyase(Eliminierungs)-Reaktionen (Aconitase, Enolase, D-Xylose Isomerase und Histidin Deaminase) weiß man, daß dort elektrophile Eigenschaften des Metalls eine Rolle spielen; es "assistiert" bei der Ablösung eines Protons von einem C-Atom und leitet somit die Bildung eines Carbanions ein (MILDVAN, 1970).

Das gleiche Problem tritt auch bei der CL auf; hier muß ebenfalls ein Proton abgespalten werden, um die Ablösung der Essigsäure zu ermöglichen. Für die Citrat-Lyase aus K. aerogenes ist es nach BUCKEL et al. (1971) wahrscheinlich die Elektrophilität der Thioestercarbonylgruppe, die an den intermediären Citroylthioestern die Spaltung der C-C-Bindung herbeiführt. Eine Beteiligung von Metallionen an dieser Spaltung erscheint zumindest nicht ausgeschlossen.

4.1.4. Bestimmung des pH-Optimums

Jedes Enzym entfaltet bei bestimmter Wasserstoffionen-Konzentration optimale katalytische Aktivität, da hiervon der Dissoziationszustand der funktionellen Gruppen abhängt. Der Konzentrationsbereich, in dem dies geschieht, kann dabei unterschiedlich breit sein. Das pH-Optimum für die CL wurde in drei Puffern (s. Abb. 19) im jeweils optimalen Pufferbereich aufgenommen:

1. Kaliumdihydrogenphosphat-di-Natriumhydrogenphosphat (nach SÖRENSEN)
   pH 5,0 - 8,0; ß = 0,03; Endkonzentration etwa 0,070 M.

2. Diäthylbarbiturat-HCl (nach L. MICHAELIS)
   pH 6,8 - 9,6; Endkonzentration 0,1 M.

3. Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (nach BATES und BOWER)
   pH 7,0 - 9,0; Endkonzentration 0,1 M.

Die dabei gemessenen Aktivitäten wurden in Abb. 19 dargestellt.

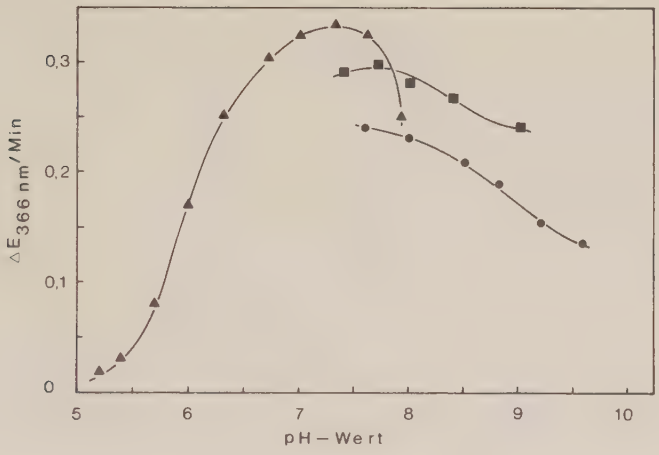


Abb. 19 pH-Optimum der Citrat-Lyase

Der verwendete Testansatz enthielt die oben aufgeführten Puffersubstanzen, die übrigen Komponenten wie in "Methoden" unter 7.1. II angegeben. Die Reaktion wurde mit 10 µl (≙ 13 µg Protein) aktiviertem Enzym (spez. Akt. 33 E/mg) gestartet.

▲–▲–▲ = KH_2PO_4/Na_2HPO_4
●–●–● = Diäthylbarbiturat-HCl
■–■–■ = Tris/HCl

Aus Abb. 19 ist zu ersehen, daß zwischen pH 7,2 und 7,4 der optimale Testbereich lag. Die bereits aus der Abb. 19 ersichtliche Unterschiedlichkeitkeit der Aktivität des Enzyms in verschiedenen Puffern ist in der folgenden Tab. 9 in ihrem quantitativen Ausmaß beschrieben.

Tab. 9 Aktivität der Citrat-Lyase in verschiedenen Puffern

Puffer	ΔE_{366}/Min.	Spez. Akt. E/mg	%
KH_2PO_4/K_2HPO_4*	0,34	48,5	100
Diäthylbarbiturat/HCl	0,24	34,2	71,3
Tris-HCl	0,30	42,8	88,2
TEA-NaOH	0,28	40,8	82,4

* Aktivität entspricht der in System KH_2PO_4/Na_2HPO_4.

Um die Messungen in 4 Puffern vergleichen zu können, wurde bei pH 7,6 gemessen. Zur Verhinderung einer ungleichmäßigen Acetylierung, die durch Art des Puffers bedingt wäre, wurde in Phosphat-Puffer, pH 7,2 acetyliertes Enzym (26 µg/Testansatz) eingesetzt.

Die Ergebnisse in Tab. 9 bestätigen nachträglich die bereits gezogene Konsequenz (s. 4.1.1.), Tests zur Bestimmung der spez. Aktivität im Phosphat-Puffer durchzuführen.

4.1.5. Ermittlung von Substratsättigungs- und K_m-Werten

In den vorigen Kapiteln wurde das obligate Bedürfnis der CL für zweiwertige Metallionen beschrieben. Wie die Beteiligung dieser Kationen an der enzymatischen Reaktion aussieht, darüber gibt es verschiedene Ansichten. HARVEY und COLLINS (1963) wiesen durch Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Citrat ($\pm Mg^{2+}$) und der Leitfähigkeit solcher Lösungen einen Mg^{2+}-Citrat-Komplex als Substrat der CL aus St. diacetilactis nach. In einer äquimolaren Lösung (1 mM) von Mg^{2+} und Citrat liegen nach ihren Ergebnissen 90 % als Mg^{2+}-Citrat vor, was eine Nutzung des verbleibenden freien Citrats als Substrat ausschließt. Die Autoren sehen es aber als möglich an, daß für die Bindung des Komplexes ein weiteres freies Mg^{2+}-Ion erforderlich ist.

Dagegen geht aus der bereits mehrfach zitierten Arbeit von WARD und SRERE (1964) hervor, daß ein Mn^{2+}- oder Mg^{2+}-Enzym freies Citrat umsetzt und daß in äquimolaren Lösungen von Mn^{2+} oder Mg^{2+} und Citrat nur 50 % als Metall-Citrat-Komplex vorliegen. Ob Citrat und Me^{2+}-Ionen zusammen am aktiven Zentrum gebunden werden oder ob ein anderer Bindungsort für die aktivierenden Kationen existiert , konnte von diesen Autoren bislang nicht geklärt werden. Nach BLAIR et al. (1966) muß das Chelat eine bestimmte Struktur haben, um gebunden zu werden (Kompetitive Hemmung durch Ca^{2+}-Chelate).

Bei der CL aus Rps. gelatinosa wurde für beide Liganden (Mg^{2+} und Citrat) der Bereich der Substratsättigung und der K_m-Wert bestimmt, indem jeweils die Konzentration des einen konstant gehalten und die des anderen variiert wurde.

Dabei wurde für Mg^{2+} und Citrat ein Konzentrationsbereich von 0,1 - 20 mM durchgemessen, außerdem wurden zwei voneinander unabhängige Bestimmungen ausgeführt. Der K_m-Wert wurde rechnerisch nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (GAUß) mittels eines Rechenprogramms für die "ideale Gerade" bestimmt. Nach diesem Verfahren wurden der Schnittpunkt mit der Ordinate (V_{max}) und die Steigung der Geraden $tg\alpha = K \times b$ ermittelt. Dabei war K eine Konstante, die sich aus dem Auftragungsmaßstab ergab; den Wert b lieferte die Rechnung.

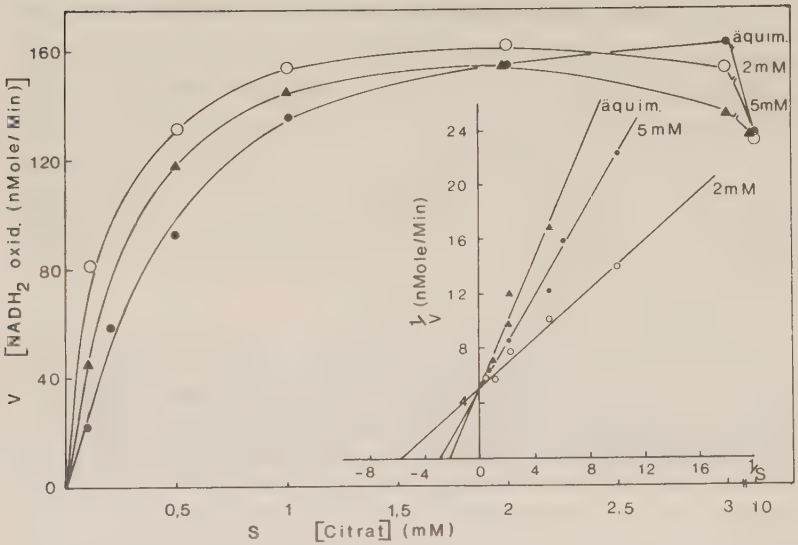


Abb. 20 Substratsättigungskurve und K_m-Wert für Citrat

Als Testsystem diente das in der Legende zu Abb. 12 angegebene mit Phosphat-Puffer statt TEA-NaOH; Mg^{2+} und Citrat wurden wie oben beschrieben variiert. 0,15 E Enzym (spez. Akt.: 24 E/mg) wurden pro Testansatz verwendet. Es wurde $MgCl_2$ eingesetzt, da dieses Salz vollständig dissoziiert (BJERRUM et al., 1958).

Zeichenerklärung:

Auftragung: v/s

○-○-○ = 2 mM Mg^{2+}
▲-▲-▲ = 5 mM Mg^{2+}
●-●-● = Mg^{2+} u. Citrat-Konz. äquimolar

Auftragung: $1/v \Big/ 1/s$

○-○-○ = 2 mM Mg^{2+}
●-●-● = 5 mM Mg^{2+}
▲-▲-▲ = Mg^{2+} u. Citrat-Konz. äquimolar

Abb. 20 zeigt normale Substratsättigungskurven ohne Zwischenplateaus, wie sie von KÜMMEL (1973) für die CI aus L. citrovorum beschrieben wurden. Die Bedeutung dieser Zwischenplateaus wurde von TEIPEL und

KOSHLAND jr. (1969) analysiert; eine K_m-Wert-Bestimmung ist in einem solchen Falle nicht möglich. Aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ging hervor, daß hier eine normale Michaelis-Menten-Beziehung vorlag. Der Schnittpunkt mit der y-Achse ($1/v_{max} = 5{,}19 \times 10^{-3}$; v_{max} = 192 nMole/Min.) war für die 3 Kurven gleich, die K_m-Werte betrugen:

2 mM Mg^{2+} = 0,17 mM
5 mM Mg^{2+} = 0,31 mM
äquimolar Mg^{2+} und Citrat = 0,41 mM
Der K_m-Wert bei 10 mM Mg^{2+} betrug 0,40 mM (nicht graphisch dargestellt).

Diese Werte stimmten hinreichend mit den für die CL aus E. coli (0,33 mM) und St. diacetilactis (0,99 mM) von WHEAT und AJL (1955) sowie HARVEY und COLLINS (1963(gefundenen K_m-Werten überein.

Aus der Auftragung $\frac{1}{v}/\frac{1}{s}$ ging hervor, daß v_{max} unverändert blieb, während K_m bei äquimolarer und steigender Mg^{2+}-Konzentration größer wurde. Betrachtete man beide Auftragungen (v/s; $\frac{1}{v}/\frac{1}{s}$) zusammen, so ließ sich nach DIXON und WEBB (1965) auf Grund des Kurvenverlaufs eine kompetitive Hemmung durch Mg^{2+} postulieren. Zur Erhärtung dieses Postulats wurden in den Abb. 21 und 22 die Auftragungen $\frac{s}{v}/s$ nach HANES (1932) und $v/\frac{v}{s}$ nach WOOLF (1932) durchgeführt. Das Resultat war nach Abb. 21 nicht eindeutig, da eine Parallelität der Geraden nicht unbedingt zu erkennen war. Dagegen erfüllte Abb. 22 die Forderungen der Theorie für einen solchen Hemmtyp nach gemeinsamen Schnittpunkten der Geradenschar auf der y-Achse.

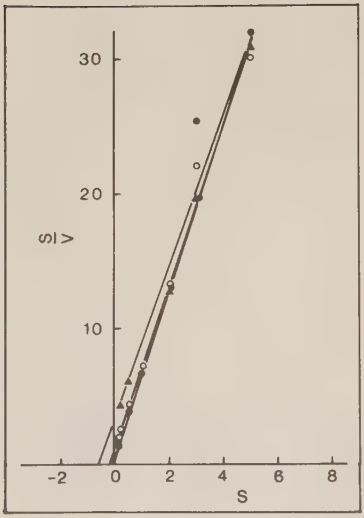
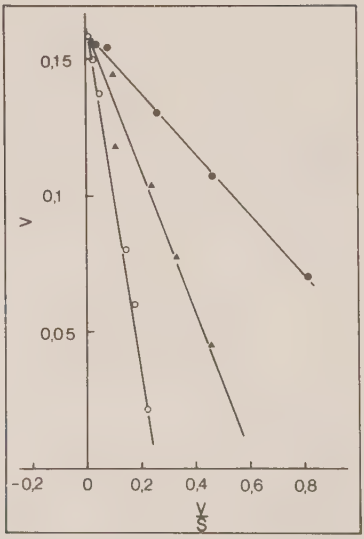


Abb. 21

Abb. 22



Nach WARD und SRERE (1964) lassen sich Hemmungen bei einem Mg^{2+}-Citrat-Verhältnis größer als äquimolar als Entzug von freiem Citrat aus dem System durch Chelatisierung erklären. Bei äquimolarer Konzentration an Citrat und Mg^{2+} war der K_m-Wert höher als bei 5 und 10 mM Mg^{2+} und zeigte damit die geringste Substrataffinität an. Offensichtlich mußte doch ein definierter Mg^{2+}-Überschuß vorhanden sein, um maximalen Umsatz zu ermöglichen. Es war nicht auszuschließen, daß die beobachtete Hemmung Folge zweier gegenläufiger Vorgänge (Chelatisierung⟷Aktivierung?) war, die voneinander zu trennen nicht möglich war. Für Mg^{2+} wurde wie für Citrat auch der Substratsättigungsbereich und der K_m-Wert bestimmt. Das Ergebnis wurde in den Abb. 23 und 24 zusammengefaßt.

Abb. 21 und 22 Kompetitive Hemmung der Citrat-Lyase durch überschüssige Mg^{2+}-Ionen

Zeichenerklärung:

Abb. 21

●-●-● = 2 mM Mg^{2+}
▲–▲–▲ = 5 mM Mg^{2+}
○–○–○ = 3 mM Mg^{2+}

Abb. 22

●–●–● = 2 mM Mg^{2+}
▲–▲–▲ = 5 mM Mg^{2+}
○–○–○ = 3 mM Mg^{2+}

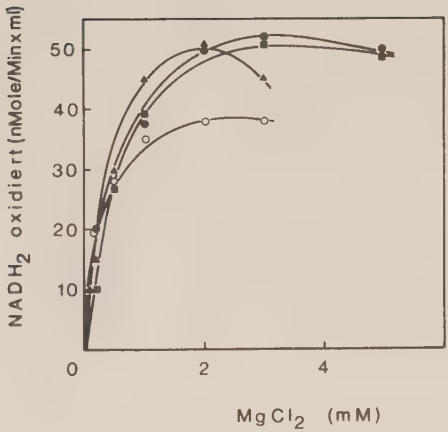
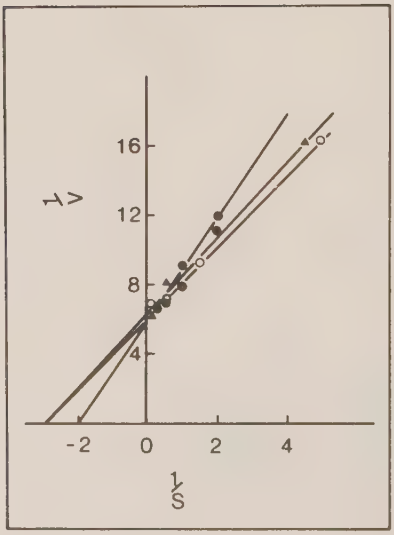

NADH2 oxidiert (nMole/Minxml)
50
40
30
20
10
0
2
4
MgCl2 (mM)

Abb. 23

Abb. 24


1/v
16
12
8
4
-2
0
2
4
1/S

K_m-Werte für Mg^{2+} wurden bei konstanten Citratkonzentrationen bestimmt; die rechnerische Auswertung war die gleiche wie für die K_m-Werte des Substrats (Citrat) beschrieben.

Bei 0,5 mM Citrat: ⟶ = 0,54 mM
Bei 2 mM Citrat: ⟶ = 0,33 mM
Bei 3 mM Citrat: ⟶ = 0,56 mM

Die K_m-Werte für Mg^{2+} lagen etwas höher als die für Citrat (0,17 - 0,4 mM). Von HARVEY und COLLINS (1963) wurde für die CL aus St. diacetilactis ein K_m-Wert für Mg^{2+} von 0,99 mM beschrieben.

Zum Abschluß dieses Kapitels sei erwähnt, daß die CL aus Rps. gelatinosa nur Citrat und kein Isocitrat oder cis-Aconitat spaltete. Sie gleicht damit in diesem Verhalten den bereits erwähnten Lyasen aus E. coli und St. faecalis.

Abb. 23 und 24 Substratsättigungskurve und K_m-Wert für Mg^{2+}

Angaben zum Testsystem s. Legende zu den Abb. 12 und 20.

Zeichenerklärung:

Abb. 23

○–○–○ = 0,5 mM
●–●–● = 2 mM
▲–▲–▲ = 3 mM
■–■–■ = 5 mM
} Citrat

Abb. 24

○–○–○ = 0,5 mM
●–●–● = 2 mM
▲–▲–▲ = 3 mM
} Citrat

4.2. Polyacrylamid-Elektrophorese als Methode zur Untersuchung von Reinheit und Aufbau der Citrat-Lyase

Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen gehört zu den leistungsfähigsten Trennmethoden für Makromoleküle überhaupt, da ihre Größe (Siebeffekt des Gels) und Bruttoladung gleichermaßen als Trennparameter ausgenutzt werden. Freilich schließen gute Trenneigenschaften Fehlinterpretationen der Ergebnisse nicht aus. Ein Protein z. B. muß noch lange nicht homogen sein, wenn es als eine Bande wandert und noch lange nicht heterogen sein, wenn mehrere Banden zu erkennen sind (RESSLER, 1973). Bevor ein Enzympräparat als elektrophoretisch rein bezeichnet werden kann, müssen Faktoren wie pH-Wert und Gelkonzentration variiert werden. Mißdeutungen, hervorgerufen durch Wechselwirkungen des Proteins mit dem Elektrophoresepuffer (CANN und GOAD, 1968), durch Konformations- und Größenisomere (EPSTEIN und SCHECHTER, 1968; RESSLER und LEE, 1970; SMITHIES, 1962; HEDRICK und SMITH, 1968) und Bindung geladener Liganden (EPSTEIN und SCHECHTER, 1968) müssen ausgeschlossen werden.

4.2.1. Analytische Disk-Elektrophorese

Auf Grund ihrer leichten Handhabung wird die diskontinuierliche (in Bezug auf pH-Wert und Gel-Konzentration) Methode häufig zur Analyse von Proteingemischen herangezogen. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß Veränderungen des pH-Wertes, wenn man sich vom physiologischen pH-Wert entfernt, zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität führen können. Dieser Umstand ist von Bedeutung, wenn neben einer passiven Proteinanfärbung auch eine Aktivitätsbestimmung im Gel durchgeführt werden soll. Enzymatische Aktivität der Citrat-Lyase war nach Elektrophorese in den angegebenen verschiedenen Systemen nicht mehr meßbar (s. Abschnitt "Methoden" 11.2. A - D und 11.3.). Die Proteinbanden, die nach Anfärbung mit Coomassie Brillant Blue erschienen, waren nicht bei allen Systemen der Anzahl nach gleich. Außerdem wurden unterschiedliche Wanderungsgeschwin-

digkeiten festgestellt, welche von Faktoren wie Porengröße des Gels und Ladungszustand der funktionellen Gruppen des Enzyms beeinflußt wurden.

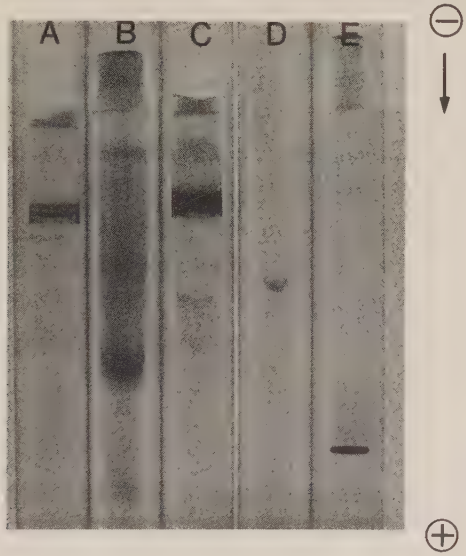


Abb. 25 Disk-Elektrophorese der Citrat-Lyase in verschiedenen Trennsystemen

A	Mittelporgel	(7,5 % Acrylamid, pH 8,9)
B	Großporgel	(3,75 % Acrylamid, pH 8,9)
C	Mittelporgel	(7,5 % Acrylamid, pH 7,5)
D	Großporgel	(3 % Acrylamid + 0,5 % Agarose, pH 7,5)
E	Großporgel	(5 % Acrylamid, pH 7,1)

Durchführung der Elektrophorese siehe "Methoden" (11.1.).
Pro Röhrchen wurden 50 µg Protein aufgetragen. Der Proteinprobe in System B wurde 5 mM EDTA zugesetzt.

Die Ergebnisse der in Abb. 25 dargestellten Elektrophorese-Läufe sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 10 Elektrophoretische Beweglichkeit der Citrat-Lyase in verschiedenen Trennsystemen

System	Bis (%)	Acrylamid (%)	Wanderungsstrecke (cm)	Laufzeit (Std.)	Wanderungsgeschwindigkeit (cm/Std.)
A	2,6	7,5	2,5	7	0,35
B	2,6	3,75	6,5	6	1,1
C	2,6	7,5	3,2	7	0,5
D	6,5	3 + 0,5 % Agarose	8,5	4,5	1,9
E	2,4	5,0	7,0	7	1,0

Die %-Angaben für Bis (Vernetzungsgrad) wurden auf die Acrylamidkonzentration bezogen. Die pH-Werte der einzelnen Systeme wurden in der Legende zu Abb. 25 aufgeführt.

Die verschiedenen Elektrophoreseläufe wurden bei gleicher Stromstärke und Temperatur durchgeführt (s. "Methoden"), so daß lediglich die Trennparameter "Bruttoladung" (abhängig vom pH-Wert) und Gelzusammensetzung verändert waren. In Systemen mit gleichem pH-Wert (A = B und C = D) sind alle funktionellen Gruppen gleich dissoziert und die Wanderungsgeschwindigkeit weitgehend eine Funktion der Porengröße des Gels.

Für die Elektrophorese der Citrat-Lyase (MG über 500 000) empfahl sich demnach ein Gel mit Polyacrylamidkonzentration von 3 - 5 % und einem Vernetzungsgrad von > 5 % (D), was die Bildung kurzfaseriger Gele begünstigte (RODBARD und CHRAMBACH, 1970). Eine Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit ergab sich durch Verschiebung des pH-Wertes ins alkalische nicht (A → C; B → D). Bei alkalischem pH-Wert (A) trat in diesem Puffersystem sogar eine teilweise Aufspaltung des Enzyms auf. Die Verschmierung des angefärbten Proteins bei (B) ist auf Zusatz von 5 mM EDTA zu-

rückzuführen, was einen Teil der Enzymmoleküle in Bruchstücke aufspaltete. In Abb. 26 ist die densitographische Auswertung eines PAA-Gels nach Elektrophorese im System (E) dargestellt.

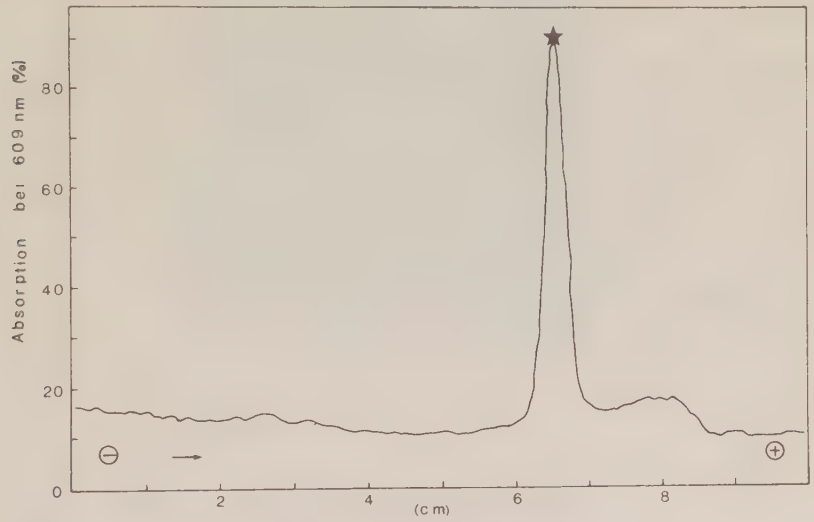


Abb. 26 Densitogramm eines Elektrophoreselaufes mit hochgereinigter Citrat-Lyase

Die Absorption des mit Coomassie Brilliant Blue angefärbten Proteins wurde bei 609 nm im Durchlichtverfahren (Flying-Spot-Densitometer, Vitatron) gemessen.

4.2.2. Kontinuierliche Plattenelektrophorese

Bei der kontinuierlichen Elektrophorese im vertikalen Plattenverfahren (s. "Methoden", 11.4.) gibt es kein Sammelgel; der pH-Wert bleibt im gesamten Gelbereich konstant. Die Konzentrierung der Probe wird durch einen hohen Reibungswiderstand erzielt, der beim Übergang der Makromoleküle vom Puffer in das Gel auftritt. Der Konzentrierungseffekt wird noch verstärkt, wenn die Probe in 1 : 4 bis 1 : 5 verdünntem Elektrodenpuffer

aufgenommen wird. Dadurch wird die Leitfähigkeit des Probenpuffers herabgesetzt, was aber andererseits die "Proben-Ionen" zu den schnellsten im System macht (NEES und RICHTER, 1972).

Das gewählte Plattenverfahren bot im Gegensatz zur Elektrophorese in PAA-Röhrchen den Vorteil, mehrere Proben nebeneinander unter identischen Bedingungen elektrophoretisch trennen und vergleichen zu können. Die Aufgabenstellung war bei beiden Methoden die gleiche. Es sollte der zweifelsfreie Beweis der elektrophoretischen Reinheit erbracht werden. Aus der Vielzahl der dazu ausgeführten elektrophoretischen Trennungen wurden nur einige repräsentativ dargestellt (Abb. 27 - 30).

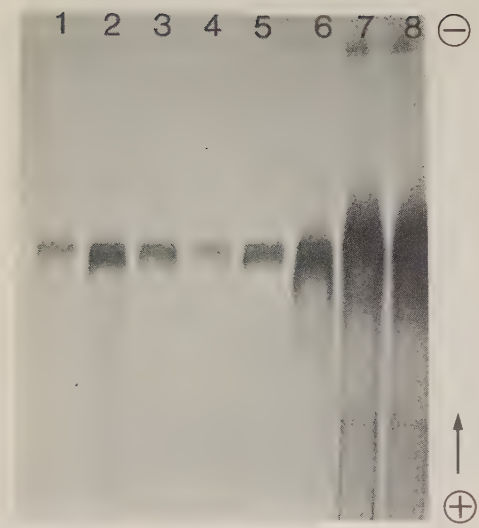


Abb. 27 Kontinuierliche Elektrophorese der Citrat-Lyase in einem PAA-Agarose-Mischgel

Durchführung der Elektrophorese siehe "Methoden" 11.4.
Laufzeit; 6 Std., bei 15 mA und 130 Volt.
Gel und Elektrodenpuffer 0,125 M Tris-Borat, pH 8,9.

Nr.		
1	6,5 µg Protein	In der Disk-Elektrophorese einheitliches Enzympräparat
2	40 µg Protein	
3	20 µg Protein	
4	10 µg Protein	
5	30 µg Protein	
6	50 µg Protein	
7	60 µg Protein	teilweise gereinigtes Enzym
8	80 µg Protein	

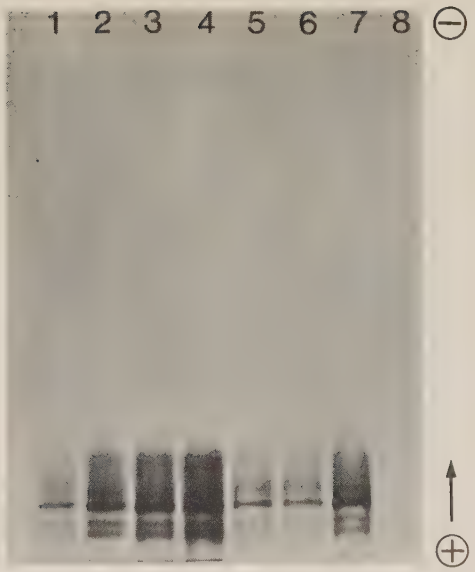


Abb. 28 Kontinuierliche Elektrophorese in einem PAA- Gel (5 %ig)

Durchführung der Elektrophorese siehe "Methoden" 11.4.
Gel- und Elektrodenpuffer 0,05 M Imidazol-DL Asparaginsäure, pH 7,3.
Laufzeit: 6 Std., bei 15 mA und 130 Volt.

Nr.		
1	5 µg Protein	Enzympräparat, welches in dem in Abb. 27 dargestellten System homogen erschien.
2	20 µg Protein	
3	30 µg Protein	
4	80 µg Protein	
5	5 µg Protein	
6	20 µg Protein	
7	50 µg Protein	
8	-	

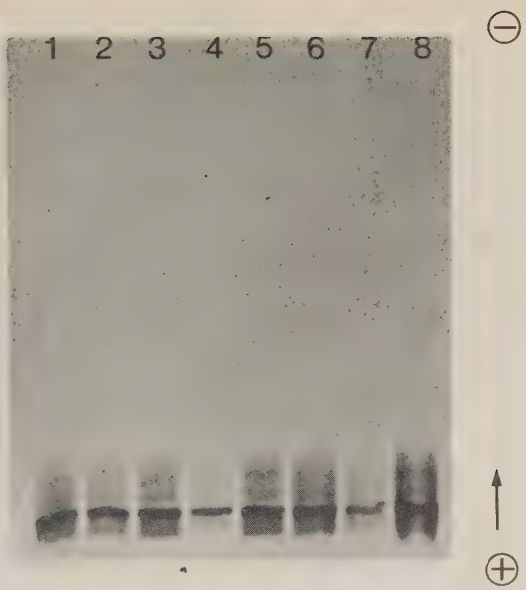


Abb. 29 Kontinuierliche Elektrophorese in einem PAA-Gel (6 %ig)

Angaben wie zu Abb. 28.
Ausnahme: Gel- und Elektrodenpuffer 0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7,1.

Nr.		
1	10 µg Protein	Enzym wie in Abb. 28
2	10 µg Protein	
3	30 µg Protein	
4	5 µg Protein	
5	25 µg Protein	
6	25 µg Protein	
7	5 µg Protein	
8	50 µg Protein	

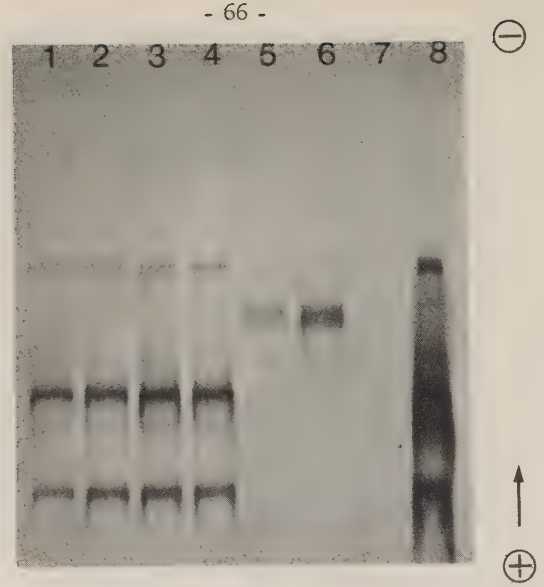


Abb. 30 Kontinuierliche Elektrophorese eines intakten und eines dissoziierten Citrat-Lyase-Präparates

Durchführung und Auswertung der Elektrophorese siehe "Methoden" (11.4.).
Gel- und Elektrodenpuffer 0,125 M Tris-Borat-Puffer, pH 8,9.
Gelzusammensetzung: 4 % Acrylamid, 0,5 % Agarose.
Laufzeit: 6 Std., bei 15 mA und 130 Volt.

Nr.		
1	5,5 µg;	Enzympräparat in Gegenwart von 3 mM Mg-EDTA
2	11,0 µg;	
3	16,5 µg;	
4	22,0 µg;	
5	6,5 µg;	Gleiches Enzympräparat wie in Abb. 28
6	13,0 µg;	
7	3,0 µg;	
8	55,0 µg	siehe 1 - 4

Bei einem Vergleich der Abb. 27 - 30 ist zu erkennen, daß mit dem Elektrodenpuffer Tris-Borat und einer Gelzusammensetzung 3 % Acrylamid + 0,5 % Agarose (Abb. 27) das günstigste Trennsystem für ein Makromolekül dieser Größe (MG CL ~ 500 000; Ø 150 Å) vorlag. PEACOCK und DINGMAN

(1968) wiesen in einem solchen Mischgel einen Trennbereich für RNA-Moleküle in der Größenordnung von 10^4 bis 10^8 Dalton nach. Eine gute Trennung war auch noch möglich, wenn das Molekulargewicht nur um wenige Prozent differierte. Für Makromoleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 500 000 und 550 000 liegt nach ihren Angaben der optimale Trennbereich bei 3 - 3,5 % Acrylamid. Der Zusatz von Agarose bewirkt eine höhere mechanische Stabilität des Gels. Die maximal penetrierbare Molekülgröße (M_o) beträgt für diesen Fall 0,9 x 10^6 Dalton (minus Agarose 1,2 x 10^6 Dalton). Aus den Abb. 28 und 29 geht hervor, daß in einem 5 - 6 %igen Gel die mittlere Porenweite für die CL bereits zu klein war (geringe verwischte Wanderungsstrecke; Protein blieb in den Taschen zurück). Hinzu kam allerdings hierbei noch die geringere Leitfähigkeit der Puffersysteme (s. Legende) gegenüber Tris-Borat. In Abbildung 30 ist eine kontinuierliche Elektrophorese zu sehen, die in einem Mischgel bestehend aus 4 % PAA und 0,5 % Agarose unter sonst gleichen Bedingungen wie in dem in Abb. 27 dargestellten Experiment durchgeführt wurde. Die Wanderungsstrecke des Gesamtmoleküls (Bahn Nr. 5, 6) war hier deutlich kürzer als in Abb. 27. Die Bruchstücke, die aus dem Gesamtmolekül unter dem Einfluß von EDTA entstanden, hatten unterschiedliche Ladung und Größe, deswegen bandierten sie an verschiedenen Stellen des Gels. Eine dem Gesamtenzym korrespondierende Proteinbande war nicht mehr zu erkennen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch nach Elektrophorese von "gealterten" CL-Präparaten.

4.2.3. Natriumdodecylsulfat- und Harnstoff-Gel-Elektrophorese; Bestimmung von Zahl und Größe der Untereinheiten

Die bereits im vorigen Kapitel beschriebene Dissoziation der CL in Gegenwart von EDTA ließ bereits die Vermutung zu, daß das Enzym aus mehreren Polypeptidketten bestand. Eine exakte Aussage über die Anzahl und Größe diese Polypeptidketten wurde von der SDS-Elektrophorese erhofft. SDS spaltet Proteine in die nativen Polypeptidketten auf und bildet mit die-

sen, bei SDS-Konzentrationen über 8×10^{-4} M (≙ 0,02 %), hochgeordnete, stäbchenförmige Komplexe, deren Länge nur vom Molekulargewicht des Proteins abhängt (REYNOLDS und TANFORD, 1970). Der SDS-Protein-Komplex ist in erster Linie das Resultat hydrophober Wechselwirkungen, wobei das Protein seine Konformation verändert (REYNOLDS und TANFORD, 1970).

Polyacrylamid-Elektrophorese in Gegenwart von SDS trennt Polypeptide nach dem Molekulargewicht auf (SHAPIRO et al., 1967; WEBER und OSBORNE, 1969), vorausgesetzt, daß sie in reduziertem Zustand vorliegen (FISH et al., 1970). Werden Disulfidbrücken nicht reduziert, so behindert dies die Ausbildung des gestreckten SDS-Protein-Komplexes, senkt das SDS-Bindungsvermögen des Proteins und vermindert damit auch die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins (WEBER et al., 1972). Eine verminderte SDS-Bindung wurde ebenfalls in Puffern hoher Ionenstärke beschrieben (REYNOLDS und TANFORD, 1970).

Von großer Bedeutung ist die Inkubation der Proteine vor der Elektrophorese, denn die Probe muß vollständig denaturiert und reduziert sein. Es sind zumindest zwei Denaturierungsprozeduren durchzuführen und zu sehen, ob das elektrophoretische Bild Unterschiede zeigt. Durch Vergleich mit Referenzproteinen von bekanntem Molekulargewicht kann dann in der Elektrophorese das Molekulargewicht einzelner Polypeptidketten bestimmt werden.

Enzympräparate der CL aus Rps. gelatinosa wurden den in "Methoden" (11.5. a - f) beschriebenen Denaturierungsverfahren unterworfen und die Bandierung in der SDS-Elektrophorese verglichen. Neben SDS wurde Harnstoff in 8 M Endkonzentration sowohl zur Denaturierung als auch im Trenngel verwendet. Aus einer Reihe von Experimenten, in denen Denaturierungsverfahren und Gelzusammensetzung variiert wurden, sind in den Abb. 31 und 32 zwei repräsentativ dargestellt.

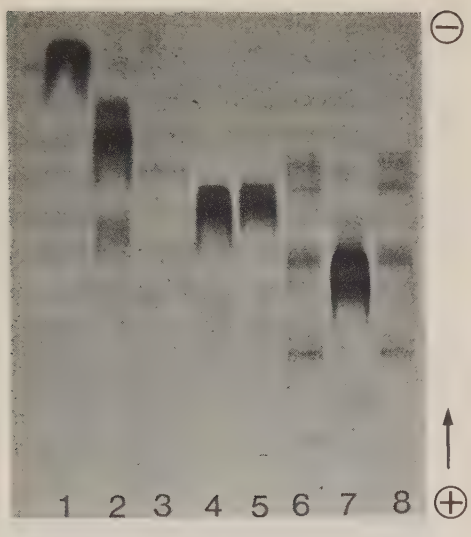


Abb. 31 SDS-Elektrophorese in einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel

Einzelheiten zu Durchführung und Auswertung siehe "Methoden" (11.6.).
Gel- und Elektrodenpuffer: 0,025 M Na-Phosphat, pH 7,1.
Laufzeit: 5 Std., bei 80 mA und 130 Volt.

Nr.		
1	80 µg Cytochrom c;	Enzym und Referenzproteine wurden unter gleichen Bedingungen denaturiert, s. "Methoden" (11.6. a).
2	80 µg Chymotrypsinogen A;	
3	40 µg Citrat-Lyase;	
4	80 µg Ovalbumin;	
5	80 µg Aldolase;	
6	60 µg Citrat-Lyase;	
7	80 µg Katalase	
8	80 µg Citrat-Lyase	

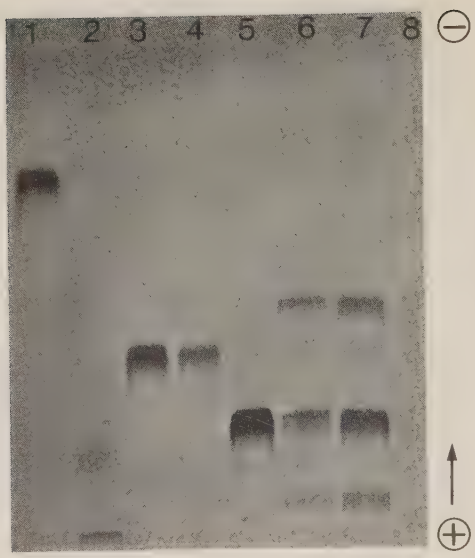


Abb. 32 SDS-Elektrophorese in einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff

Details zur Ausführung siehe "Methoden" (11.6.).
Elektrodenpuffer: 0,025 M Na-Phosphat, pH 7,1; Gelpuffer wie Elektrodenpuffer + 8 M Harnstoff.
Laufzeit: 5 Std., bei 80 mA und 130 Volt.

Nr.		
1	70 µg Cytochrom c;	Enzym und Referenzproteine wurden unter gleichen Bedingungen denaturiert, s. "Methoden" (11.6. b).
2	70 µg ß-Galaktosidase;	
3	70 µg Ovalbumin;	
4	70 µg Aldolase;	
5	70 µg Katalase;	
6	40 µg Citrat-Lyase;	
7	80 µg Citrat-Lyase;	
8	10 µg Citrat-Lyase (keine Proteinanfärbung)	

Ein Vergleich von verschieden denaturierten Enzymproben in Acrylamidgelen gleicher Zusammensetzung ergab, daß stets 3 Proteinbanden unterschiedlicher Intensität (s. Abb. 33) auftraten. Diese Banden waren je nach Zusammensetzung des Trenngels verschieden scharf (vergleiche Abb. 31 und 32). Als vorteilhaft für eine Schärfung der Banden erwies sich ein Ein-

schluß von 8 M Harnstoff in 10 %iges Acrylamidgel (mit 0,1 % SDS). Diese Beobachtung wurde auch von SWANK und MUNKRES (1971) sowie DREYER et al. (1970) beschrieben und ist auf eine Reduzierung der effektiven Porengröße des Gels zurückzuführen, was eine Verstärkung des Siebeffektes bewirkt. Ein reines Harnstoffgel ohne SDS ergab keine Trennung des aufgetragenen Proteins.

Für die quantitative Bestimmung der Molekülgröße wurden die Gelplatten densitometrisch ausgewertet, was eine genauere Festlegung der Bandenmitte gestattete. Die Abb. 33 zeigt ein solches Densitogramm.

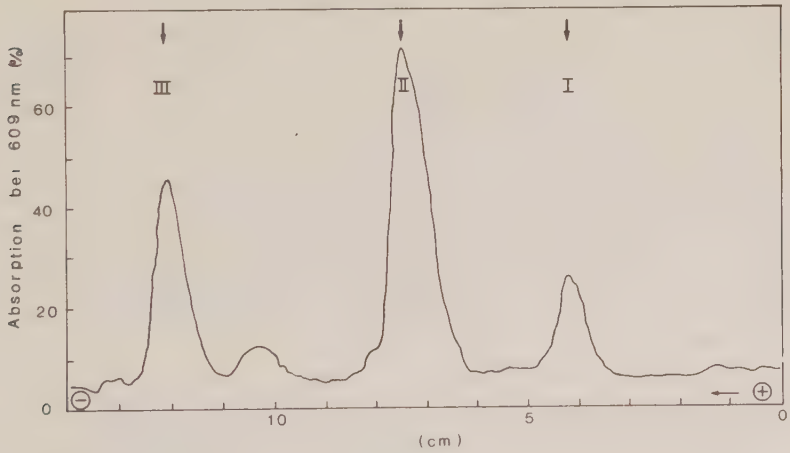


Abb. 33 Densitometrische Darstellung eines dissoziierten Citrat-Lyase-Präparates nach Elektrophorese in einem SDS-Harnstoffgel

Die dargestellte Proteinprobe enthielt 80 µg Protein; übrige Angaben wie in der Legende zu Abb. 32.

Nach SHAPIRO et al. (1967) ist die elektrophoretische Beweglichkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes proportional. Den Bereich der Proportionalität geben die Autoren für ein 5 %iges Acrylamidgel von 15 000 - 90 000 Dalton an.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der CL wurden wie bereits angeführt verschiedene Acrylamidgele verwendet (s. Tab. 11), denn die Porenweite des Gels entscheidet über Trennschärfe und Fehlergröße bei der Bestimmung des Molekulargewichtes. Nach FAWCETT und MORRIS (1966) liegt bei einem 5 % Gel ohne Harnstoff (Quervernetzer zu Acrylamid = 1 : 35) die mittlere Porengröße bei 32 Å (10 % Gel = 16 Å). Diese war offensichtlich für die Untereinheiten der CL zu groß, denn die Trennschärfe war gering (Abb. 31). Um die Porengröße zu verringern, konnte entweder mehr Quervernetzer (Bis) eingesetzt werden oder 8 M Harnstoff, da dieser 40 % - 50 % des penetrierbaren Volumens einer sphärischen Gelpore ausfüllt (SWANK und MUNKRES, 1971). Weil Harnstoff außerdem die Dissoziation von Proteinen fördert, erschienen Acrylamidgele mit diesem Zusatz geeigneter. In Tabelle 11 sind die verschiedenen Geltypen zusammengestellt. Die R_f-Werte (elektrophoretische Beweglichkeit) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$R_f = \frac{\text{Wanderungsstrecke Protein} \times \text{Gellänge vor Anfärben}}{\text{Gellänge nach Entfärben} \times \text{Wanderungsstrecke Indikatorfarbstoff}}$$

Tab. 11 Bestimmung des Molekulargewichtes der CL durch SDS-Elektrophorese; Wanderungsstrecke und R_f-Werte

	Molekular-gewicht (Dalton)	Gelsyst. I 5% Acryl-amid (cm)	R_f	Gelsyst. II 10% Acryl-amid (cm)	R_f	Gelsystem III a (cm)	R_f	b (cm)	R_f	c (cm)	R_f	d (cm)	R_f	e (cm)	R_f
Cytochrom c	11 700	15,7	0,98	13,2	0,97	11,5	0,79	13,8	0,86	14,1	0,88	12,2	0,76	12,4	0,88
Chymotryp-sinogen A	25 700	12,5	0,78	10,8	0,80	-	-	-	-	-	-	9,1	0,57	8,4	0,60
Ovalbumin	43 000	10,8	0,67	9,2	0,66	7,1	0,49	9,9	0,62	9,1	0,57	-	-	-	-
Aldolase	40 000	10,8	0,67	9,4	0,69	6,9	0,48	9,7	0,61	9,0	0,56	6,6	0,41	5,8	0,41
Katalase	58 000	8,8	0,55	7,5	0,55	5,3	0,37	7,9	0,50	7,6	0,49	4,5	0,28	3,6	0,26
ß-Galak-tosidase	130 000	4,4 7,5	0,27 0,46			2,4 4,4	0,17 0,30	-	-	3,1 6,0	0,2 0,3	-	-	-	-
Citrat-Lyase Bande I	-	5,6	0,35	4,5	0,33	3,1	0,21	5,7	0,36	4,4	0,28	2,7	0,17	1,6	0,12
Citrat-Lyase Bande II	-	8,5	0,53	7,2	0,53	5,3	0,37	7,5	0,53	6,4	0,40	4,7	0,29	3,7	0,26
Citrat-Lyase Bande III	-	11,5	0,71	10,0	0,74	8,3	0,57	11,0	0,69	10,3	0,64	7,5	0,46	6,4	0,45

Legende zu Tab. 11 siehe Seite 74.

Legende zu Tab. 11

Angegeben sind die Wanderungsstrecken der Polypeptide in (cm) und die R_f-Werte.
Gelzusammensetzung (vollständige Angaben in "Methoden" 11.6.) und Durchführung der Elektrophorese

Gelsystem I: 5 % Acrylamid
Laufzeit 5 Std.; 80 mA und 130 Volt.

Gelsystem II: 10 % Acrylamid
Laufzeit 5 Std.; 80 mA und 130 Volt.

Gelsystem III: a. 10 % Acrylamid + 8 M Harnstoff
Laufzeit 4,5 Std.; 80 mA und 130 Volt

b. 10 % Acrylamid + 8 M Harnstoff
Laufzeit 5 Std.; 80 mA und 130 Volt

c. 10 % Acrylamid + 8 M Harnstoff
Laufzeit 5,5 Std.; 80 mA und 150 Volt

d. 5 % Acrylamid + 8 M Harnstoff
Laufzeit 4,5 Std.; 80 mA und 150 Volt

e. 10 % Acrylamid + 8 M Harnstoff
Laufzeit 5 Std.; 80 mA und 150 Volt

Das Verhältnis Bis zu Acrylamid betrug in allen Fällen 1 : 35.

Die Bezeichnung Bande I, II und III für CL-Proben wurde in der Reihenfolge abnehmenden Molekulargewichtes gewählt (s. Abb. 33). Die Molekulargewichte der Referenzproteine wurden von WEBER und OSBORN (1969) übernommen. In Abb. 34 wurden die Mittelwerte der R_f-Werte des Gelsystems III a - e gegen log MG aufgetragen.

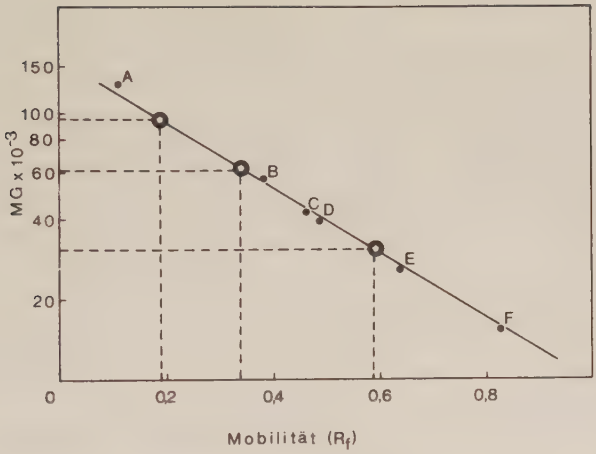


Abb. 34 Bestimmung des Molekulargewichtes der CL-Untereinheiten

Die Gelsysteme a - e wurden in der Legende zu Tab. 11 beschrieben. Als Indikatorfarbstoff wurde Bromphenolblau verwendet. Zur Sichtbarmachung von Proteinbanden schon während der Elektrophorese wurde mit Remazol Brillant Blue R nach der Methode von GRIFFITH (1972) gefärbt. Referenzproteine: (MG siehe Tab. 11)

A = ß-Galaktosidase (schwere Bande); B = Katalase; C = Aldolase; D = Ovalbumin; E = Chymotrypsinogen A; F = Cytochrom c

Die bei den Bestimmungen a - e ermittelten Molekulargewichte wurden in Tab. 12 zusammengefaßt.

Aus der in Abb. 34 gezeigten Auftragung der Geradenschar a - e wurden für die drei Enzymbanden durch Interpolation, für Bande I zum Teil durch Extrapolation, die Molekulargewichte ermittelt (Tab. 12). Bei Gelen dieses Vernetzungsgrades waren die Werte für die Molekulargewichte mit einem Fehler von $\pm$ 5 % behaftet (SWANK und MUNKRES, 1971). Der Wert für Bande I hatte noch einen zusätzlichen Fehler, da er außerhalb des Proportionalitätsbereiches lag.

Tab. 12 Molekulargewichte der Untereinheiten

	Gelsysteme					Mittelwert
	a	b	c	d	e	a - e
Citrat-Lyase Bande I	108 000	102 000	95 000	92 000	90 000	97 000
Citrat-Lyase Bande II	62 000	57 000	66 000	60 000	60 200	61 000
Citrat-Lyase Bande III	28 000	25 000	29 000	33 000	37 000	30 500

Bezeichnung der Gelsysteme siehe Legende zu Tab. 11.

Als Ergebnis der MG-Bestimmung nativer Polypeptidketten der CL aus Rps. gelatinosa war festzuhalten: In der SDS-Elektrophorese zeigten sich drei unterschiedlich starke Banden (s. Abb. 33); bei mehr als 48 Std. mit 8 M Harnstoff (unter reduzierten Bedingungen) inkubierten Enzympräparaten verschwand Bande I (MG = 97 000) fast völlig. Da aber keine neue Bande auftrat, konnte Bande I nur Dimere (Bande II + III) repräsentieren, die bei längerer Reduktion (48 Std.) in die Monomeren aufspalteten.

4.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Citrat-Lyase und ihrer Untereinheiten

4.3.1. Analytische Ultrazentrifugation

Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge waren erst möglich, nachdem der Nachweis der elektrophoretischen Reinheit der CL erbracht worden war (4.2.1. und 4.2.2.). Ein mit Fremdprotein behaftetes Enzympräparat würde unter Gleichgewichts-Sedimentations-Bedingungen nicht in einem symmetrischen Peak sedimentieren, was sich dann in der Auftragung log c gegen r^{2*} (Abb. 35) in einer Beziehung exponentieller und nicht linearer Art äußert (YPHANTIS, 1964). Dieser zusätzliche Reinheitbeweis des CL-Präparates war nur ein Nebenprodukt, das bei der Lösung der beiden Hauptaufgaben mit anfiel.

1. Bestimmung des Molekulargewichtes und der Sedimentationskonstanten des Gesamtmoleküls.

2. Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Untereinheiten.

Das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls wurde bei niedriger Geschwindigkeit (s. "Methoden" 12.1.) für verschiedene Proteinkonzentrationen (A_{280} 0,2 - 1,0) ermittelt (Abb. 35 und 36).

* s. Legende zu Abb. 35

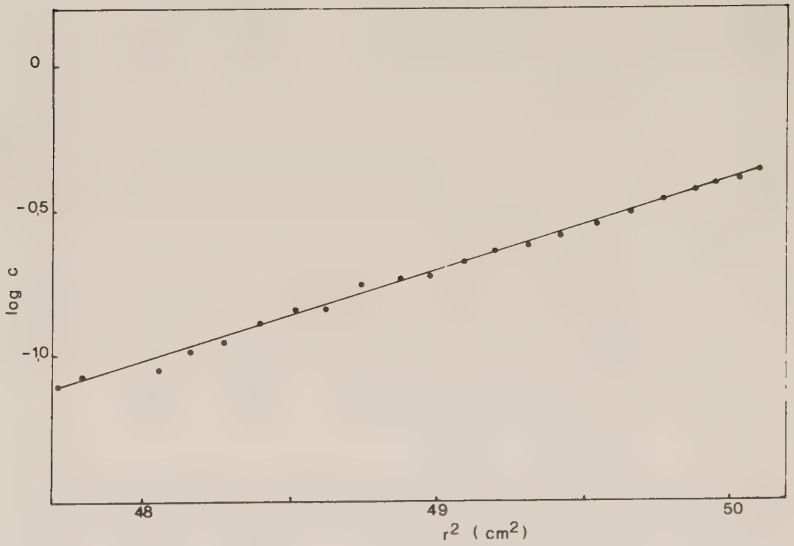


Abb. 35 Gleichgewichts-Sedimentation des Gesamtmoleküls in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Durchführung der Zentrifugation ist in "Methoden" (12.1.) beschrieben.

log c = Logarithmus der Proteinkonzentration (E_{280})

r^2 = Abstand von der Rotorachse (cm^2)

Die Sedimentation wurde mit einem photoelektrischen Scanner verfolgt.

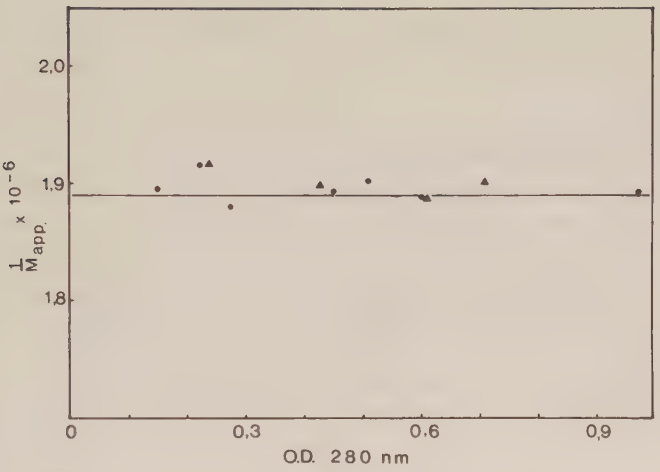


Abb. 36 Berechnung des Molekulargewichtes für das Gesamtmolekül

Ordinate: $\frac{1}{M_{app.}}$ (Mapp. ≙ Molekulargewicht unter Meßbedingungen)
Abszisse : Proteinkonzentration (O.D. 280 nm)

Das Molekulargewicht wurde durch Extrapolation auf die Proteinkonzentration c - 0 ermittelt. Die dafür benötigte Gerade wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt.

$y = mx + b$; $m = 0{,}028$; $b = 1{,}89$

Aus dieser Berechnung resultierte für das MG ein Wert von 529 100, in welchem die Streuung der Meßwerte berücksichtigt worden war.

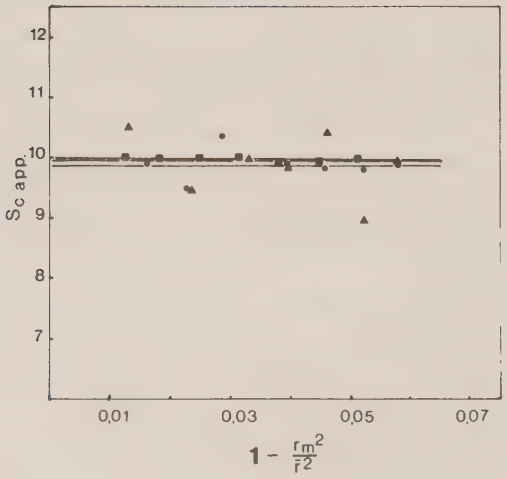
Das partial-spezifische Volumen wurde mit 0,73 ml/g angenommen.

Sedimentationsexperimente mit der intakten CL wurden stets in Gegenwart von 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Nach den Untersuchungen von BOWEN und MORTIMER (1971) an der CL aus K. aerogenes wird durch Zusatz von Mg^{2+} eine Dissoziation des Enzymkomplexes verhindert. Der Wert von 529 000 für das MG des Gesamtmoleküls wurde trotzdem nur erreicht, wenn frisch angereichertes Enzym (max. eine Woche alt) eingesetzt wurde. Mit "gealterten" Enzympräparaten wurden dagegen Molekulargewichte zwischen 354 000 und 443 000 bestimmt. Auf diesen Befund wird in Abschnitt (4.4.1.)

im Zusammenhang mit elektronenoptischen Aufnahmen der CL weiter eingegangen.

Für die CL aus K. aerogenes wurden zum Vergleich von MAHADIK und SIVA RAMAN (1968) sowie BOWEN und MORTIMER (1971) Molekulargewichte von 575 000 bzw. 547 000 bestimmt.

Neben dem Molekulargewicht wurde als weiterer Parameter die vom MG abhängige Sedimentationsrate oder Svedberg-Konstante bestimmt (Abb. 37).



Als Ergebnis von drei unabhängigen Bestimmungen (Abb. 37, I, II, III) wurden für $S_{20,w}$ Werte von 14,97 (I), 14,50 (II) und 14,65 (III) erhalten. Daraus resultierte ein Mittelwert von 14,71. Zum Vergleich seien die von MAHADIK und SIVA RAMAN (1968), BOWEN und ROGERS (1962) und BOWEN und MORTIMER (1971) ermittelten S-Werte aufgeführt. Die Autoren fanden für die CL aus K. aerogenes $S_{20,W}$-Werte von 16,0; 16,2 bzw. 17,6. Neben einer Charakterisierung des Gesamtenzyms durch Ultrazentrifugation war es auch wünschenswert, mit dieser Methode die Untereinheiten zu untersuchen. In Abschnitt 4.2.3. wurde bereits über entsprechende Experimente mit der SDS-Elektrophorese berichtet. Eine Zusammenstellung der Ultrazentrifugationsexperimente in Gegenwart eines denaturierenden Agenz ist in Tab. 13 gegeben.

Abb. 37 Bestimmung der Svedberg-Konstanten für das Gesamtmolekül

Durchführung der Bestimmungen siehe "Methoden" (12.1).

Ordinate: $S_{c\ app}$ = Apparenter S-Wert unter Meßbedingungen in definierter Konzentration

Abszisse: $1 - \frac{r_m^2}{\bar{r}^2}$

r_m^2 = Quadrat der Entfernung des Meniskus von der Rotationsachse

$\bar{r}^2$ = Entfernung der "boundary" von der Rotationsachse.

Der apparente S-Wert ($S_{c\ app}$) wurde auf Standardbedingungen korrigiert und als $S_{20,W}$ angegeben, d. h. auf den Wert umgerechnet, den er in einem Lösungsmittel hätte, das die Viskosität und die Dichte von Wasser bei 20° C hat. Nach der Definition ist ein Sedimentationskoeffizient von 1 x 10^{-13} eine Svedberg-Einheit. Es ist jedoch in der Literatur nicht gebräuchlich, den Faktor x 10^{-13} bei der Angabe von $S_{20,W}$ einzusetzen.

I = ▲–▲–▲ ;
II = ●–●–● ;
III = ■–■–■ ;

Zeichenerklärung: Durch unterschiedliche Symbole sind drei Meßserien gekennzeichnet.

Tab. 13 Bestimmung des Molekulargewichtes von CL-Untereinheiten

Inkubationsbedingungen	UZ MG I	UZ MG II	SDS-Elektrophorese I	SDS-Elektrophorese II	SDS-Elektrophorese III
2 M Harnstoff 0,1 M PO_4, pH 7,2	194 000 (3)	377 000 (3)	-	-	-
4 M Harnstoff 0,1 M PO_4, pH 7,2	75 000 (2)	198 000 (2)	-	-	-
6 M Harnstoff 0,1 M PO_4, pH 7,2	47 000 (7)	104 000 (5)	-	-	-
8 M Harnstoff 0,1 M PO_4, pH 7,2	42 000 (8)	95 000 (6)	30 500	61 000	97 000

Durchführung der Experimente siehe "Methoden" (12.1.).
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die aus der in Klammern stehenden Zahl von Zentrifugationen ermittelt wurden. Zum Vergleich wurden die mit der SDS-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichte der Untereinheiten in der zweiten Hälfte der Tabelle angegeben.

Die CL dissoziierte unter diesen Sedimentations-Bedingungen in Gegenwart von Harnstoff in zwei verschieden große "Bruchstücke". Mit zunehmender Harnstoff-Konzentration wurden diese kleiner und ergaben bei 6 M und 8 M Harnstoff-Konzentration Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 47 000 bzw. 42 000. Nicht nur mathematische Gründe (vergleiche Spalte I und II in Tab. 13) sprachen dafür, dieses als kleinste Untereinheit und die größeren "Bruchstücke" (z. B. mit MG = 95 000) als Dimere oder noch größere entsprechend als n-mere anzusehen. Vergleicht man die Ergebnisse von UZ und SDS-Elektrophorese (in Gegenwart von 8 M Harnstoff), so stimmten die Molekulargewichte für die Dimeren (95 000/97 000) überein. Während nach UZ-Daten diese aus zwei gleich großen (2 x 42 000) Monomeren bestehen, ergab die SDS-Elektrophorese zwei Monomere unterschiedlicher Größe (30 500 und 61 000).

4.3.2. Dichtegradienten-Zentrifugation

Gradientenzentrifugation in Sucroselösungen wurde von DE DUVE et al. (1959) sowie von BRITTEN und ROBERTS (1960) zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten von Viren, Mitochondrien und Ribosomen herangezogen.

MARTIN und AMES (1961) übertrugen diese Methode auf Moleküle mit geringerem MG; sie bestimmten die Sedimentationskonstanten für mehrere Enzyme (MG >300 000) in einem Gemisch von Referenzproteinen und dem zu untersuchenden Enzym. Eine gegenseitige Beeinflussung der Proteine konnte durch Experimente mit Eichproteinen von genau charakterisiertem Sedimentationsverhalten ausgeschlossen werden.

Makromoleküle wandern in einem Gradienten zunehmender Dichte mit gleichbleibender Geschwindigkeit (gültig für den Temperaturbereich von 3 - 15° C), daher ist das Verhältnis der Entfernungen, die zwei Substanzen vom Meniskus aus zurückgelegt haben, immer konstant. Für die Bestimmung der Svedberg-Konstanten genügt bei dieser Methode die relative Lage der Banden. Das Verhältnis R kann theoretisch nach jeder beliebigen Zentrifugationsdauer bestimmt werden.

$$R = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Unbekannten}}{\text{Wanderungsstrecke des Standards}} = \frac{S_{20,W}\ \text{Unbekannt}}{S_{20,W}\ \text{Standard}} \qquad (1)$$

Diese Beziehung ist streng genommen nur für Makromoleküle mit gleichem partiellem spezifischem Volumen gültig. Es ist allerdings nur ein geringer Fehler, wenn man für jedes beliebige Protein ein spezifisches Volumen von 0,735 cm^3/g annimmt.

Für die CL aus K. aerogenes wurde von BOWEN und ROGERS (1965) ein partial-spezifisches Volumen von 0,735 cm^3/g bestimmt. Das vorstehend

bezüglich der Methode geschriebene gilt für jeden Gradienten unterschiedlicher Dichte, unabhängig von der Art des Gradientenmaterials. Ein Problem im Zusammenhang mit dem Gradientenmaterial trat bei der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten der CL auf. Nach Zentrifugation in einem Sucrose-Gradienten war keine enzymatische Aktivität der CL mehr meßbar, wohl aber die der Referenzenzyme Urease und Katalase. Als Erklärung für dieses Phänomen kam eine Schädigung des Enzyms durch den in Sucroselösungen herrschenden hohen osmotischen Druck (4 000 cm Wassersäule in einer 5 %igen (w/w) Lösung) in Frage. Ein Kontrollexperiment mit Ficoll, dem hochpolymeren Vernetzungsprodukt von Sucrose und Epichlorhydrin (MG$\sim$400 000), bestätigte diese Vermutung. In einer 5 %igen (w/w) Ficoll-Lösung beträgt der osmotische Druck nur 1 % des in einer Sucrose-Lösung gleicher Konzentration vorliegenden (PRETLOW et al., 1969).

Gute Trenneigenschaften zeigte ein flacher Gradient von 2 - 5 % (w/w) Ficoll; die Dichte in diesem Bereich entspricht der von Sucrose (1,005 - 1,018 g/ml). Die Gradienten wurden kontinuierlich geformt und nach Stabilisierung mit dem Proteingemisch (Urease, Katalase, Cytochrom c, CL je 0,5 mg) beschickt (s. "Methoden"). Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenröhrchen wie beschrieben ausgetropft, Aktivität bzw. Absorption bestimmt und dann graphisch ausgewertet (Abb. 38).

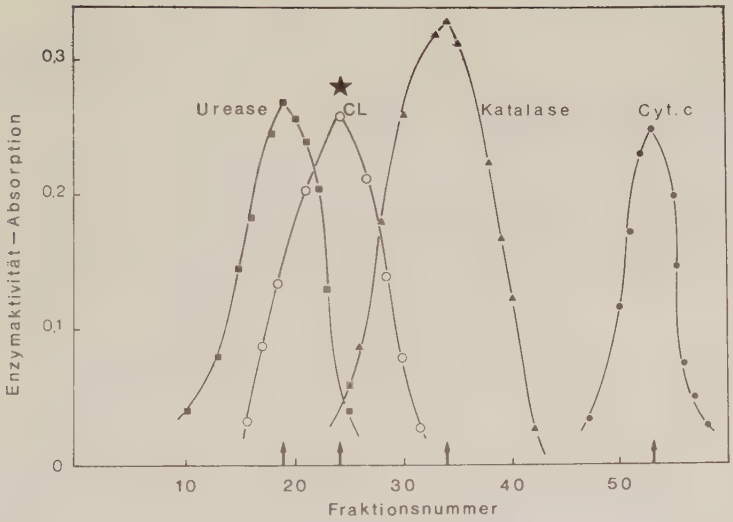


Abb. 38 Sedimentation der Citrat-Lyase in einem linearen Ficoll-Gradienten

13,8 ml eines linearen Ficoll-Gradienten (2 - 5 %, w/w in 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2) wurden mit 0,5 ml des Proteingemisches vorsichtig überschichtet und 12 Std. bei 40 000 U/Min. zentrifugiert. Die Laufstrecke der Proteine ergibt sich als Quotient aus der Fraktionsnummer mit der höchsten Aktivität und der Gesamtzahl der Fraktionen. Nummerierung der Fraktionen in der Reihenfolge des Austropfens. Durch (↑) wurde das Maximum der Peaks markiert.

Die mit Gleichung (1) ermittelten Sedimentationskonstanten ermöglichten eine grobe Approximierung des Molekulargewichtes nach der von SCHACHMAN (1959) für sphärische Proteine aufgestellten Formel:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left(\frac{MG_1}{MG_2}\right)^{\frac{2}{3}} \quad * \qquad (2)$$

MG_2 berechnete sich daraus nach:

$$\lg S_1 - \lg S_2 = \frac{2}{3} (\lg MG_1 - \lg MG_2) \quad (3)$$

$$\frac{3}{2} (\lg S_1 - \lg S_2) = \lg MG_1 - \lg MG_2 \quad (4)$$

$$\lg MG_1 = \boxed{\lg MG_2 + \frac{3}{2} (\lg S_1 - \lg S_2)} \quad (5)$$

* Index $_1$ = Unbekanntes Protein

Index $_2$ = Standard

Bei der Auswertung war zu beachten, daß die Fraktion mit der niedrigsten Gradientenmittelkonzentration auch die niedrigste Fraktionsnummer erhalten mußte. Der Sedimentationskoeffizient, $S_{20,W}$ für CL wurde nach Gleichung (1) aus dem Wert R und dem Sedimentationskoeffizienten des Standardproteins ermittelt. Dieser Wert wurde in Gleichung (5) eingesetzt, was eine Berechnung des Molekulargewichtes ermöglichte (Tab. 14)

Tab. 14 Bestimmung von R, Sedimentationskonstante und Molekulargewicht der CL

Standardprotein	R	$S_{20,W}$	MG x 10^3
Katalase	1,37	15,48	395
Urease	0,82	15,14	357

Die Werte für Molekulargewicht und Sedimentationskonstante der Standardproteine wurden aus der Literatur übernommen.

Katalase: MG = 247 000; $S_{20,W}$ = 11,3

Urease: MG = 483 000; $S_{20,W}$ = 18,6

Die nach dieser Methode ermittelten Werte für das Molekulargewicht liegen relativ niedrig (vergl. 4.3.1.). Diese Beobachtung machte bereits FRIEDEN (1959) bei Gradientenzentrifugation der Glutamat-Dehydrogenase, die wie die CL aus Untereinheiten aufgebaut ist. Eine teilweise Dissoziation des Enzyms im Gradienten war als Erklärung für dieses Ergebnis nicht auszuschließen. Die Sedimentationskonstanten stimmten dagegen mit dem in der UZ ermittelten (Mittelwert = 14,71) recht gut überein.

4.3.3. Säulenchromatographie mit Sepharose 6 B

Der von LATHE und RUTHVEN (1956) für Stärkegele gefundene Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen (V_e) einer Substanz und ihrem Molekulargewicht ist auch in Sephadex Dextran- und Agarose-Gelen gültig (PORATH und FLODIN, 1959; ANDREWS, 1962). Die Relation zwischen Elutionsvolumen und Molekulargewicht ist abhängig vom Molekültyp, daher muß für jede Verbindungsklasse (z.B. Polysaccharide, Nucleinsäuren, globuläre Proteine) mit den entsprechenden Eichsubstanzen gearbeitet werden (DETERMANN und MICHEL, 1966). Eine Vielzahl von Experimenten hat gezeigt, daß das Elutionsvolumen globulärer Proteine weitgehend von ihrem Molekulargewicht abhängt (z. B. WHITAKER, 1963 und ANDREWS, 1964); über einen weiten Bereich ist ihr Elutionsvolumen eine lineare Funktion des logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichtes (CARNEGIE, 1965; ANDREWS, 1965).

Die Bestimmung der Elutionsvolumina (V_e) von CL und Referenzenzymen wurde wie in "Methoden" (9.4.) beschrieben mit einer Sepharose 6 B-Säule durchgeführt. Die Verteilung der Proteine in den aufgetragenen Fraktionen wurde durch Bestimmung der Aktivität (Urease, Glu-DH, Katalase, Aldolase und CL) oder durch Messung der Absorption (Ferritin, Cytochrom c) ermittelt. Das Ausschlußvolumen (V_o) wurde mit Dextranblau zu 249 ml bestimmt (Abb. 39). Das Gesamtvolumen des Gelbettes (V_t) betrug 740 ml. Damit war die Berechnung des Verteilungskoeffizienten K_{av} als von der Geo-

metrie der Säule unabhängigem Parameter möglich.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$; (s. Legende zu Abb. 40)

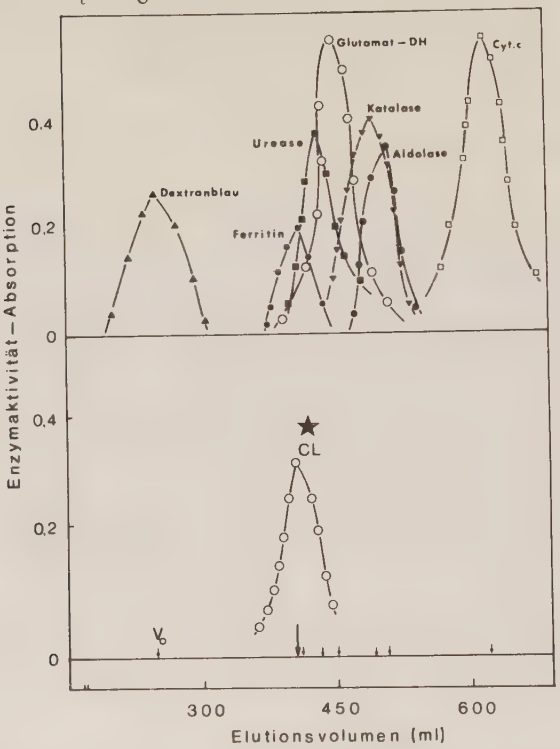


Abb. 39 Elutionsprofil eines Proteingemisches zur MG-Bestimmung der CL mit Sepharose 6 B-Chromatographie

(↓) auf der Abszisse geben das Peakmaximum und damit auch das Elutionsvolumen V_e der einzelnen Komponenten des Gemisches an. Detaillierte Angaben zur Gelfiltration mit Sepharose 6 B befinden sich in "Methoden" (9.4.).

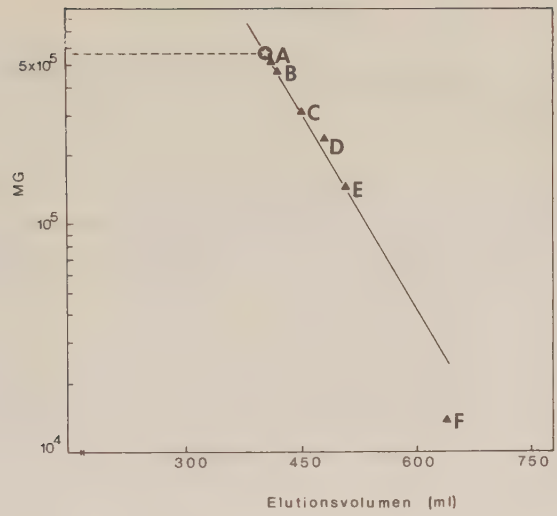


Abb. 40 Molekulargewichtsbestimmung mit Sepharose 6 B

Referenzproteine:	MG	K_{av}
A = Ferritin	540 000	0,34
B = Urease	483 000	0,37
C = Glutamat-DH	312 000	0,41
D = Katalase	240 000	0,50
E = Aldolase	147 000	0,53
F = Cytochrom c	13 500	0,76
✪ = Citrat-Lyase	560 000	0,32

Die Auftragungen Elutionsvolumen (V_e) gegen log MG (Abb. 40) und K_{av} gegen log MG (nicht dargestellt) ergaben lineare Beziehungen. Cytochrom c fiel bei diesen Auftragungen heraus; es konnte bei der Chromatographie lediglich als "marker" für das Ende der Trennung verwendet werden.

In zwei unabhängigen Säulenläufen wurde für das Molekulargewicht der CL ein Wert von 560 000 bestimmt; K_{av} = 0,32. Dieser Wert war neben dem statistischen mit einem zusätzlichen Fehler behaftet, da mangels eines geeigneten Referenzproteins mit einem MG > CL extrapoliert werden mußte.

4.3.4. Trennung der Untereinheiten der Citrat-Lyase durch Säulenchromatographie

Eine Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration ist nicht nur für ein globuläres Protein, sondern auch für eine einzelne Polypeptidkette möglich (DAVISON, 1968). Voraussetzungen für die Anwendbarkeit dieser Methode sind:

1. Die Gelfiltration muß in Gegenwart einer denaturierenden Substanz (SDS, Harnstoff, Guanidin-HCl) durchgeführt werden, welche aber keine Adsorption mit dem Gelmaterial eingehen darf.

2. Die Polypeptidketten müssen vollständig reduziert sein, damit sie unter Einwirkung der denaturierenden Verbindung die gleiche Konformation (Kugel, Ellipsoid) einnehmen können.

Sind diese Bedingungen erfüllt, so steht das Elutionsverhalten eines Proteins in linearer Beziehung zum Logarithmus seines Molekulargewichtes (FISH et al., 1969; FISH et al., 1970; YOSHINO und TAKAGI, 1973). Nach Untersuchungen der genannten Autoren sind Agarose-Gele am besten geeignet. Für ein 6 %iges Agarose-Gel sind Molekulargewichtsbestimmungen in einem weiten MG-Bereich von 1 000 - 80 000 möglich (für 4 %: 10 000 - 300 000). So bot sich diese Methode an, die mit anderen Verfahren für die CL gefundene Anzahl und eventuell auch Größe der Untereinheiten zu überprüfen. In den Abb. 41 und 42 sind Gelfiltrationen in Gegenwart von SDS und Harnstoff dargestellt.

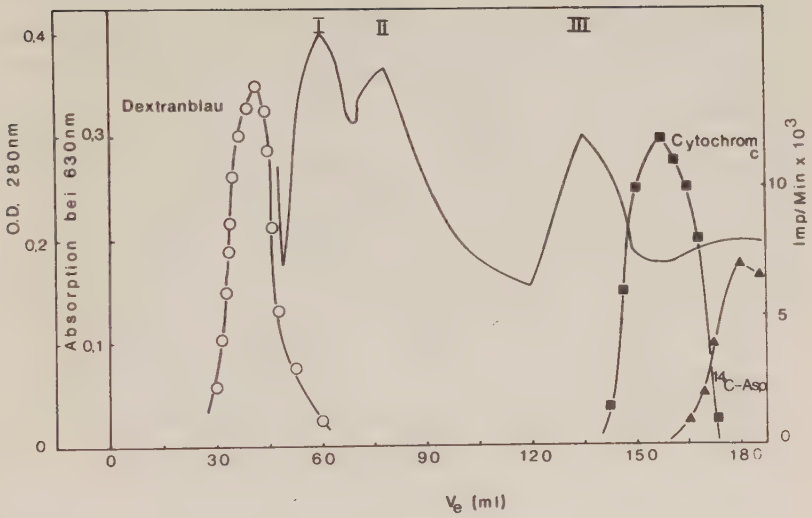


Abb. 41 Gelfiltration der Citrat-Lyase-Untereinheiten in Gegenwart von SDS und Harnstoff

Durchführung der Gelfiltration siehe "Methoden" (14.2.).
5,2 mg CL und 5 mg Cytochrom c wurden in Gegenwart von 1 % SDS, 8 M Harnstoff + 1 % 2-Mercaptoäthanol 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen der Proben auf die Sepharose 4 B-Säule wurden zu dem Gemisch 5 mg Dextranblau und 0,05 ml 4-C^{14}-Aspartat (≙ 50 000 lpm) hinzugefügt.
Peaks I, II und III entsprechen CL "Untereinheiten".
Mittelwert des Fraktionsvolumens: 1,5 ml.

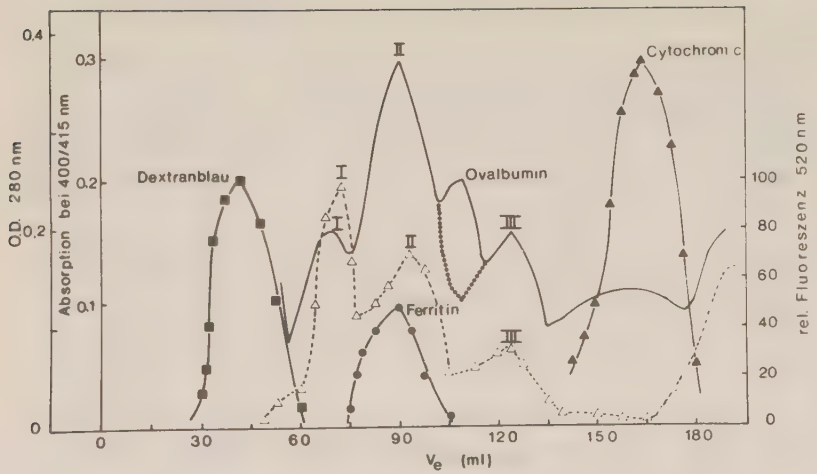


Abb. 42 Gelfiltration der Citrat-Lyase-Untereinheiten in Gegenwart von Harnstoff

Durchführung der Gelfiltration siehe "Methoden" (14.2.).
5 mg CL in 2 ml 0,1 M PO_4-Puffer, pH 7,4 wurden nach der Methode von YOSHINO und TAKAGI (1973) dansyliert. Danach wurde das Protein zusammen mit 5 mg Ferritin, 5 mg Ovalbumin und 5 mg Cytochrom c in Gegenwart von 8 M Harnstoff + 3 mM DTE 36 Stunden unter N_2-Atmosphäre inkubiert. Zu diesem Proteingemisch wurden 5 mg Dextranblau gegeben; danach erfolgte Auftragung auf die Säule.
Peaks I, II und III entsprechen CL "Untereinheiten".
Mittelwert des Fraktionsvolumens: 1,5 ml.

———— = Proteinabsorption bei 280 nm
– – – – – = Fluoreszenzmessung des dansylierten CL-Präparates bei 520 nm.

Mit ●●●●●●●● wurde der Verlauf des Proteinprofils (280 nm) für CL minus Ovalbumin markiert. Das Ende der Filtration zeigte der Peak der Dansylsulfonsäure △–△–△ an.

Als Ergebnis der Gelfiltration nativer Polypeptidketten der CL war festzuhalten, daß das Enzym aus zwei Untereinheiten verschiedener Größe (II, III, Abb. 41, 42) bestand. Die dritte "Untereinheit" (I), sie wurde in der SDS-Elektrophorese bereits als Dimer angesprochen, verschwand unter stark reduzierten Bedingungen weitgehend (vergl. Abb. 41 und 42), was ebenfalls für ein Dimer sprach.

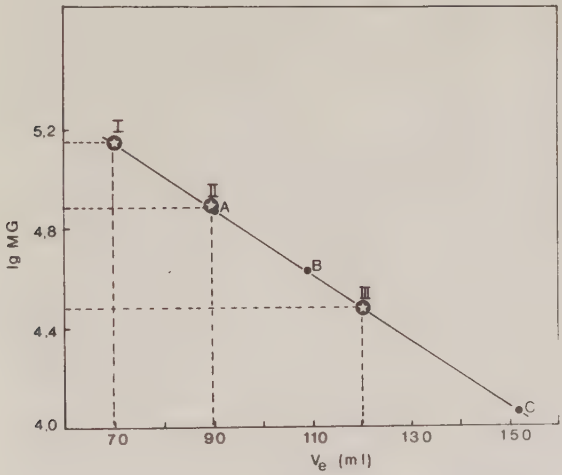


Abb. 43 Gelfiltration der Citrat-Lyase-Untereinheiten in 8 M Harnstoff-Lösung

In der Abbildung sind die dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte der Referenzproteine gegen das Elutionsvolumen (V_e) aufgetragen.

A = Ferritin (76 000); B = Ovalbumin (43 000);
C = Cytochrom c (11 700); I, II, III = CL-Protein

In der Abb. 43 wurde der Versuch einer quantitativen Auswertung der Gelfiltrations-Experimente gemacht. Es ist kein Zweifel daran, daß diese Werte nur als Näherungswerte anzusehen sind, dies gilt insbesondere für den

Wert zu Peak I, da er bereits außerhalb des Proportionalitätsbereiches lag. Entscheidender war schon die qualitative Aussage des Experimentes, insbesondere bezüglich der Information zu der "Untereinheit" I.

Aus der Abb. 43 wurden folgende Werte entnommen:

CL-Untereinheiten	log MG	MG
I:	5,2	145 000
II:	4,9	75 000
III:	4,5	30 000

4.4. Untersuchungen zur Feinstruktur der Citrat-Lyase

4.4.1. Elektronenoptische Darstellung

Eine Reihe von Enzymkomplexen sind bereits mit dem Elektronenmikroskop untersucht worden; z. B. Pyruvat-Dehydrogenase (α-Ketosäure-Dehydrogenase) aus E. coli (WILLMS et al., 1967) und Glutamin-Synthetase ebenfalls aus E. coli (SHAPIRO und GINNSBURG, 1968).

Elektronenmikroskopische Darstellungen der CL sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus der Literatur nicht bekannt. Die Aufgabenstellung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der CL aus Rps. gelatinosa war neben einer Aufklärung der Struktur des nativen Enzyms auch die Überprüfung der mit hydrodynamischen Meßmethoden (UZ, Elektrophorese, Gelfiltration) ermittelten Daten zu Molekülgröße und Sub-Struktur. Die folgende Abbildung (Abb. 44) zeigt das für CL-Präparationen aus Rps. gelatinosa typische Bild. Es war eine überwiegend homogene Population von ringförmigen Strukturen mit optisch leerem Innenraum zu erkennen, zum Teil waren diese Ringe unvollständig. Daneben wurden noch zwei weitere Arten von Gebilden (s. Pfeilmarkierung) sichtbar, die weiter unten interpretiert

werden.

Abb. 44 Elektronenoptische Darstellung der Citrat-Lyase nach dem Negativ-Kontrastierungsverfahren

Angaben zur Fixierung und Kontrastierung des Enzympräparates s. "Methoden" (13.).

Vergrößerung: 130 000 x.

Die verschiedenen Molekülformen sind durch Pfeile markiert (↓ , ↓ , ↓).

Abb. 45

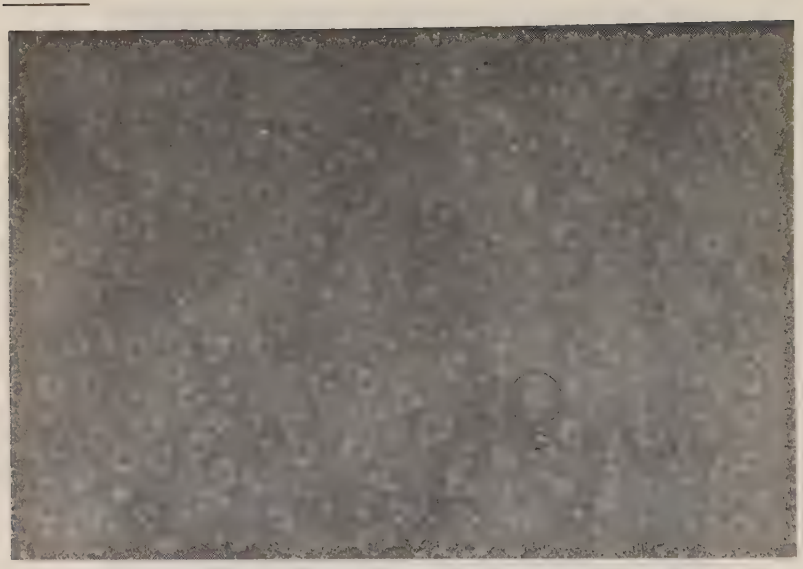


Abb. 46

Der Häufigkeit nach war der Anteil der Ringstrukturen (a) bei weitem überwiegend, wenn enzymatisch voll aktive Enzympräparate mikroskopiert wurden. In inaktiven oder mit 8 M Harnstoff behandelten Enzympräparaten waren nur sehr wenige Bruchstücke mit mehr als zwei Untereinheiten oder gar intakte Ringe zu erkennen. Der Zusammenhang zwischen enzymatischer Aktivität und der Anzahl intakter Ringstrukturen ließ vermuten, daß es sich hierbei um die native Gestalt des Enzymmoleküls handelte; die Einzelglieder dieses ringförmigen Moleküls mußten demnach die nativen Untereinheiten sein. Diese waren in den vorangehenden Abbildungen 45 und 46 in rotationssymmetrischer Anordnung zu erkennen, ohne daß allerdings genau gesagt werden konnte, wieviele dieser Untereinheiten einen Ring bildeten. Zwischen 5 und 7 Untereinheiten schienen möglich.

Bei der Interpretation dieser Bilder durfte nicht vergessen werden, daß es sich hier nicht um ebene Gebilde, sondern um Moleküle mit ausgeprägter räumlicher Gestalt handelte. Deshalb erschien ein ringförmiges Gebilde nur in der direkten Aufsicht, während in der Seitenansicht (Verlängerung der Ringebene zum Betrachter) sich das in Abb. 45 (c) gezeigte Bild bot. Dort waren zwei aufeinanderliegende Scheiben zu erkennen, woraus zu folgern war, daß die CL aus zwei übereinanderliegenden Ringen bestand. In Abb. 47 war dies noch deutlicher zu erkennen; dort lagen zwei Enzymmoleküle nebeneinander in einem Aggregat vor, das den "Doppel-Sandwich"-Aufbau zeigte.

Abb. 45 und 46 Charakterisierung der elektronenmikroskopisch sichtbar gemachten Strukturen

Die Abbildungen 45 und 46 sind vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 44.
Vergrößerung: 320 000 x.

a = Ringstruktur; b = Dreierstruktur; c = Sandwichstruktur

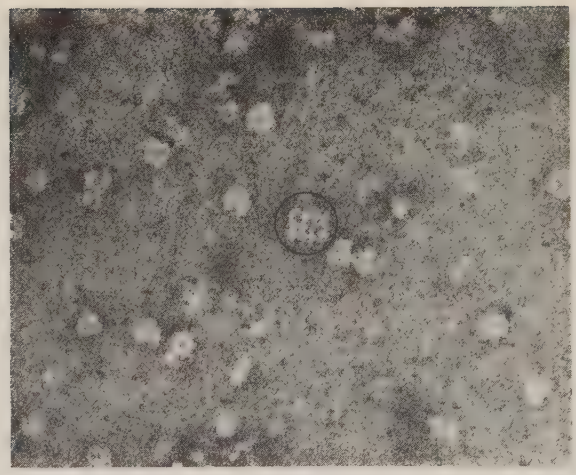


Abb. 47 Ausbildung eines Enzymaggregates durch zwei Citrat-Lyase-Moleküle

Angaben zur Fixierung und Kontrastierung des Enzympräparates s. "Methoden" (13.).
Vergrößerung: 485 000 x.

Nachdem feststand, daß die CL aus zwei übereinanderliegenden Ringen bestand, war die Frage zu klären, aus wievielen Untereinheiten die beiden Ringe aufgebaut waren. Diese Frage war auf Grund der photographischen Aufnahmen allein nicht zu beantworten, vielmehr erforderte es die Anwendung einer besonderen Technik.

Der Aufbau der Ringe wurde mit Hilfe der "Markham-Rotation" bewiesen (MARKHAM, 1963). Diese Methode war geeignet, um Symmetrieverhältnisse solcher Moleküle zu klären. Verwendet wurden Negative von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der CL aus Rps. gelatinosa. Durch Projektion des Bildes auf einen drehbaren Untergrund, der mit Fotopapier belegt wurde, ließ sich je nach Größe des Drehwinkels (5 x 72°; 6 x 60°;

7 x 51,5°) eine Verstärkung oder Abschwächung des Kontrastes der einzelnen Untereinheiten erzielen. Die so ermittelte Anzahl von Untereinheiten ergab als eindeutiges Ergebnis den Wert 6 (Abb. 48), was eine hexagonale Symmetrie impliziert.

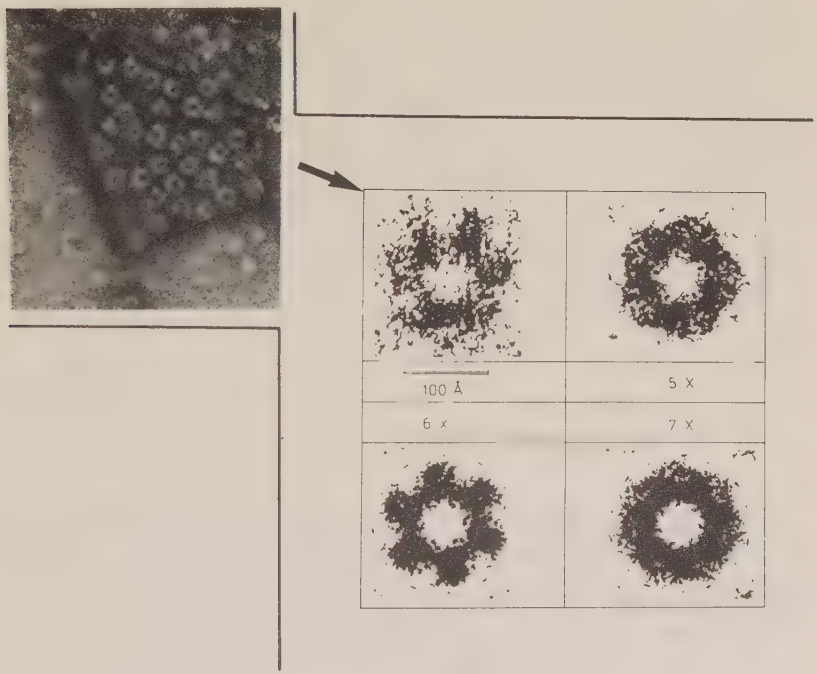


Abb. 48 Markham-Rotation mit der Citrat-Lyase

Im linken Teil der Abbildung ist die Originalaufnahme der Citrat-Lyase wiedergegeben, die zur Markham-Rotation verwendet wurde. Vergrößerung: 550 000 x.

Neben einer Ausmessung der Untereinheiten auf der Photographie war eine mathematische Bestimmung ihrer Dimensionen möglich. Diese basierte auf einer von ZIPPER et al. (1971) aufgestellten Beziehung von Volumen zu Molekulargewicht von 1,37 ± 0,12 $Å^3$/Dalton. In Tab. 15 wurden danach die Abmessungen der einzelnen Untereinheiten berechnet.

Tab. 15 Bestimmung der Größe der Untereinheiten aus ihrem Volumen

MG Dalton	Volumen $Å^3$	Durchmesser Å
60 500	83 000	54,2
31 000	42 000	43,0

Das Volumen wurde nach $^4/_3 \; r^3$ berechnet.

$$r = \sqrt[3]{\frac{V \cdot 3}{4}}$$

4.4.2. Bestimmung von SH-Gruppen

MAHADIK und RAMAN (1968) wiesen für die CL aus K. aerogenes durch Titration mit DTNB 8 Mol SH/Mol Enzym nach, während sie mit pCMB 72 Mol erhielten. COTTAM und SRERE (1969) fanden in der ATP-CL (Rattenleber) etwa 50 Mol SH/Mol Enzym,von denen 6 - 8 Mol von Bedeutung für die Enzymaktivität waren und schnell mit DTNB reagierten.

In Abschnitt 2.3. wurde im Zusammenhang mit dem Reaktionsmechanismus der CL aus Rps. gelatinosa bereits gezeigt, daß die aktive Form des Enzyms (Acetyl-S-Enzym) durch Desacetylierung in die inaktive Enzym-SH-Form überging. An diesem SH-Enzym wurde die quantitative Bestimmung der SH-Gruppen mit DTNB nach ELLMAN (1959) durchgeführt.

Da das SH-Enzym leicht zum S-S-Enzym oxidierte, wurde die Enzymlösung vor der Titration mit DTT reduziert und anschließend von diesem durch Säulenchromatographie wieder befreit (Abb. 49).

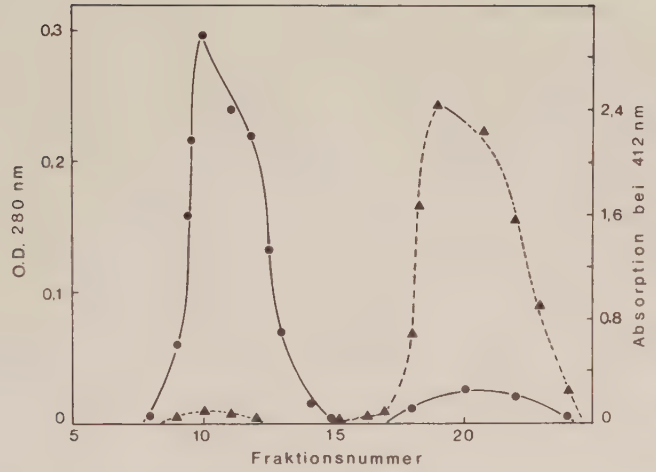


Abb. 49 Trennung von reduzierter Citrat-Lyase und überschüssigem DTT durch Säulenchromatographie

5 ml Enzymlösung (100 mM PO_4, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$) mit einem Proteingehalt von 0,5 mg/ml nach WARBURG und CHRISTIAN (0,6 mg/ml nach LOWRY) wurden auf ein Volumen von 1,5 ml konzentriert. Diese Lösung wurde mit DTE zu 3 mM Endkonzentration versetzt und 20 Min. bei 30° C inkubiert. Danach wurde an einer gegen 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 äquilibrierten G-25-Säule (1,5 x 30 cm; Füllhöhe 25 cm) chromatographiert. Eluiert wurde mit entlüftetem Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,2). Nach Kontroll-Titration eines aliquoten Teils jeder Fraktion (0,5 - 0,9 ml) mit DTNB, wurden die Fraktionen mit hohem Proteingehalt (Nr. 10 - 12) vereinigt und für die Bestimmung verwendet.

Zeichenerklärung:

●—●—●—● = Absorptionskurve des Proteins bei 280 nm

▲—▲—▲—▲ = Absorptionskurve des bei der Titration der SH-Gruppen entstehenden p-Nitrothiophenol Anions bei 412 nm

Tab. 16 Titration von SH-Gruppen

Inkubations-bedingungen	nano Mole Enzym/ Testansatz	ΔE_{412}	nano Mole SH /Testansatz	Mol SH/Mol Enzym
teilweise oxidiertes Enzym (a)	1,9	0,44	32,4	17
reduziertes Enzym (b)	0,28	0,08	5,8	21
reduziertes Enzym (c) + 8 M Harnstoff	0,28	0,14	10,2	36
reduziertes Enzym (d) + 1 % SDS	0,37	0,2	14,7	54
reduziertes Enzym (e) + 10 mM EDTA	0,37	0,13	9,5	26
reduziertes Enzym (f) + 1,75 mM Acetanhydrid	0,37	0,12	8,9	20

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml: DTNB 0,07 mM; Tris-Phosphat bzw. Tris-HCl 40 mM, pH 8,1; Enzymprotein 0,15 - 1,4 mg. Die Reaktionen wurden über 45 Min. bei 412 nm (1 cm Lichtweg) verfolgt. Zur Berechnung wurde der von ELLMAN (1959) angegebene Extinktionskoeffizient - 13,6/M/cm^2 - verwendet. Spez. Aktivität des teilweise oxidierten Enzyms: 28 E/mg. Spez. Aktivität des reduzierten Enzyms: 85 E/mg. Die angegebenen Werte in der Tabelle sind z. T. Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen. Für die Berechnung des Enzymgehaltes auf molarer Basis ging ein Molekulargewicht der CL von 545 000 ein.

In Tab. 16 sind freie SH-Gruppen (a, b) und entmaskierte SH-Gruppen (c, d, e) nach Zusatz von denaturierenden Substanzen titriert worden.

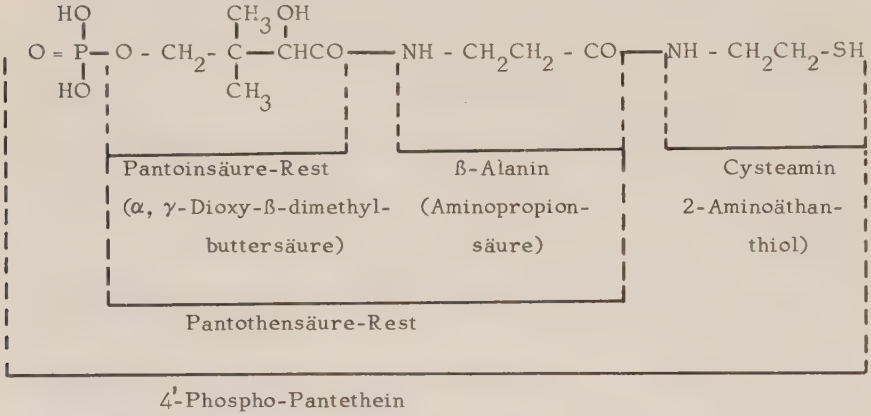
Aus der Literatur sind Beispiele von Enzymen bekannt, Glutamat-DH, Citrat-Synthase, deren SH-Gruppen erst titrierbar waren, nachdem mit Hilfe von denaturierenden Substanzen (Aceton, Harnstoff, SDS, EDTA) eine Änderung der Proteinkonformation erzwungen wurde (BITENSKY et al., 1965; SRERE, 1965). Bei Bestimmung (f) sollte ein höherer Anteil an SH-Gruppen durch Acetylreste geschützt sein, was aber wahrscheinlich durch die hohe Desacetylierungsrate bei diesem pH-Wert (pH 8,1) verhindert wurde. Vergleicht man die für a und b erreichten Werte vor und nach der Reduktion (17 bzw. 21 SH-Gruppen) mit den korrospondierenden spez. Aktivitäten (28 bzw. 85 E/mg), so steht einer Verdreifachung der spezifischen Aktivität nur eine Zunahme der freien SH-Gruppen um 4 gegenüber. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen freien SH-Gruppen und enzymatischer Aktivität konnte von SRERE (1965) für die Citrat-Synthase gezeigt werden.

Eine vollständige Hemmung der CL-Aktivität durch Blockierung der SH-Gruppen mit Jodessigsäure war bei einer Konzentration von 2×10^{-4} M gegeben.

4.4.3. Bestimmung von Pantothensäure

Untersuchungen an der Fettsäure-Synthetase haben ergeben, daß eine Untereinheit dieses Multienzymkomplexes das Acyl-Carrier-Protein (ACP), 4-Phosphopantethein in Phosphodiester-Bindung enthält. An diesem werden Acyl-Gruppen als Thioester kovalent gebunden (LYNEN, 1961; MAJERUS et al., 1965; PUGH und WAKIL, 1965). In Analogie zur Fettsäure-Synthetase war es in der CL ebenfalls möglich, stöchiometrische Mengen an Pantothenat (2 - 3 Mol/Mol Enzym) nachzuweisen (SRERE et al., 1972; DIMROTH et al., 1973). Die letztgenannten Autoren lokalisierten Panto-

thenat auf bestimmten CL-Untereinheiten vom MG 10 000, die sie "Acyl-Carrier-Proteine" nannten. 4-Phosphopantethein war somit in der CL wie in der Fettsäuresynthetase als Substratbindungsort anzusehen.



In Experimenten mit CL aus Rps. gelatinosa war zu prüfen, ob die beschriebenen Ergebnisse auch für dieses Enzym gültig waren.

Pantothensäure - nicht Pantethein, dieses ist nur unter milden alkalischen Bedingungen stabil - wurde mikrobiologisch mit L. plantarum bestimmt, nachdem die Säure durch Alkali-Hydrolyse aus dem Enzym freigesetzt worden war (s. Tab. 17 und "Methoden", 15.). Da sich in der Literatur verschiedene Angaben über die Bedingungen dieser Hydrolyse fanden, wurden die angegebenen Methoden und Variationen davon in Bezug auf die Freisetzung von Pantothensäure verglichen (Tab. 17).

Tab. 17 Bestimmung von Pantothensäure in hydrolysierten CL-Präparaten

Nr.	Hydrolyse-bedingungen	Protein (mg)	Citrat-Lyase (n Mole)	Pantothenat (n Mole)	Mole Pantothenat / Mol Enzym
a	1,0 N KOH 2 Std.; 100° C	1,8	3,2	9,4	2,9
b	0,2 N KOH 2 Std.; 100° C	0,75	1,4	3,7	2,6
c	1,0 N KOH 4 Std.; 105° C	1,2	2,2	3,0	1,3
d	1,0 N KOH 4 Std.; 110° C	2,6	4,8	9,8	2,0
e	1,0 N KOH 13 Std.; 110° C	0,75	1,4	0,9	0,7

Legende zu Tab. 17 siehe S. 106.

Legende zu Tab. 16:

Die Hydrolyse von CL wurde in Anlehnung an die von PUGH und WAKIL (1965) sowie BUCKEL et al. (1971) gemachten Angaben durchgeführt (s. "Methoden", 15.). Die mikrobiologische Bestimmung von Pantothenat erfolgte nach einer Difco-Vorschrift (1971). Als Standard wurde eine Eichkurve mit Ca-Pantothenat aufgenommen (5 - 25 ng). MG der CL 545 000. Die Zahlenwerte in der Tabelle sind als rechnerisch ermittelter Gesamtgehalt an Pantothenat pro Hydrolyseansatz anzusehen. Bestimmungen wurden mit aliquoten Teilen davon durchgeführt.

Die in Tab. 17 zusammengestellten Ergebnisse zeigten, daß längere Hydrolysezeiten (c - e) nicht mehr, sondern weniger Pantothensäure erbrachten. Unter den als optimal anzusehenden Bedingungen (a, b) wurden 3 Mole Pantothenat/Mol Enzym nachgewiesen. Um sicherzustellen, daß mit dieser Bestimmungsmethode sämtliche im Enzym gebundene Pantothensäure erfaßt wurde, erfolgten Kontrollbestimmungen mit Coenzym A als Pantothensäure-Donator (Tab. 18).

Tab. 18 Bestimmung von Pantothensäure in Hydrolysaten von Coenzym A

CoA eingesetzt (n Mole)	Pantothenat nachgewiesen (n Mole)	Ausbeute (%)
3,25	1,36	42
6,5	4,3	66
9,75	5,4	55

Die Zahlenangaben wurden auf den Gesamtansatz bezogen, die Bestimmungen wurden mit Teilmengen durchgeführt. Weitere Angaben zur Bestimmung s. "Methoden" 15.1., 2. und Legende zu Tab. 17. Untere Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode: 5 ng Pantothenat ≙ 0,023 n Mole.

Bei sämtlichen Bestimmungen wurde mit Pantothensäure aus Coenzym A Hydrolysaten nur zwischen 40 und 70 % des erwarteten Pantothenats erzielt. Es ergab sich also ein erheblich zu niedriger Wert. Als Erklärung für diesen experimentellen Befund kamen drei Möglichkeiten in Betracht:

1. Die biologisch aktive Form ist die D (+) Pantothensäure. Es wäre denkbar, daß durch thermische Einflüsse eine teilweise Racemisierung zur inaktiven Form stattfand. Dafür sprach der abnehmende Pantothensäuregehalt mit zunehmender Hydrolysedauer (Tab. 17).

2. Ein Teil der Pantothensäure lag noch als Pantethein vor und wurde deshalb nicht von L. plantarum verwertet. Dies sollte aber in 1 N KOH nach 2-stündiger Hydrolyse nicht mehr der Fall sein (PUGH und WAKIL, 1965).

3. Die Pantothensäure lag trotz Behandlung mit alkalischer Phosphatase z. T. noch in der phosphorylierten Form vor. Die Aktivität der Phosphatase wurde zwar überprüft, was aber nicht ausschließt, daß in dem Enzymhydrolysat eine quantitative Umsetzung nicht erfolgte.

Die Frage, welche Erklärung als die Richtige anzusehen war, wurde und konnte nicht entschieden werden. Es erschien aber ratsam, Pantothensäure in einer Form als Standard einzusetzen, in der sie der gleichen Behandlung unterworfen war wie die Probe. Daher wurde die folgende Bestimmung auf Pantothensäure-Standard aus Coenzym A-Hydrolysat bezogen (Abb. 50).

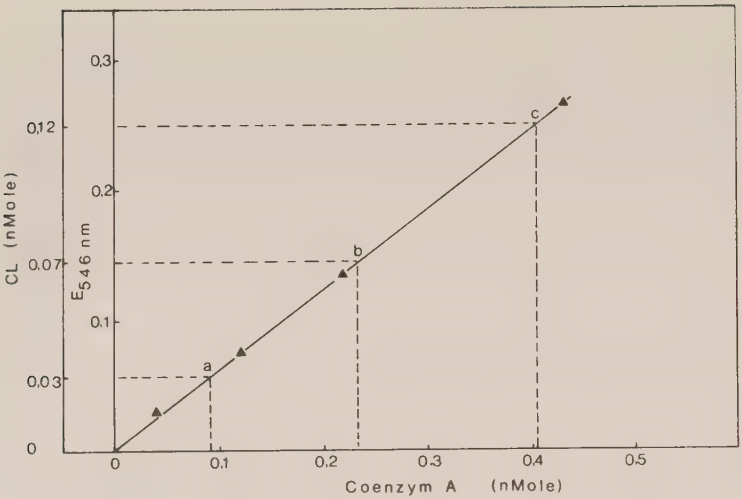


Abb. 50 Bestimmung von Pantothensäure in der Citrat-Lyase mit Coenzym A-Hydrolysaten als Standard

Die Extinktionswerte (E_{546}) der Wachstumsbestimmung sowie die Menge an hydrolysiertem Enzym wurden gegen nano Mole CoA aufgetragen. Die Hydrolyseansätze für die Bestimmung und die Standards enthielten äquimolare Mengen an hydrolysierbarer Substanz (3,25; 6,5 und 9,75 n Mole). Aliquote Teile davon wurden zur Wachstumsbestimmung eingesetzt. Übrige Angaben siehe Legenden zu Tab. 17 und 18. Die dargestellte Eichkurve basiert auf Mittelwerten aus drei Bestimmungen. Mit a, b, c wurden die den eingesetzten Enzymmengen korrespondierenden CoA-(Pantothenat)Mengen bezeichnet.

Aus der Auftragung in Abb. 50 ergab sich, daß ein Mol Enzym 3,1 (a); 3,2 (b); 3,4 (c) Mole Pantothenat enthielt. Daraus war zu folgern, daß der Pantothensäuregehalt der CL zumindest bei 3 Mol/Mol lag; wahrscheinlich aber noch höher. Den exakten Wert zu bestimmen war vorläufig nicht möglich.

Für die CL aus K. aerogenes konnte, wie bereits erwähnt, von DIMROTH und Co-Autoren Pantothenat nur in bestimmten Untereinheiten des Multi-

enzym-Komplexes, den 4 Acyl-Carrier-Proteinen (MG 10 000), nachgewiesen werden. Eine Untereinheit von dieser Größe gab es in der CL aus Rps. gelatinosa zwar nicht, aber auch hier lag die Vermutung nahe, daß nur bestimmte Untereinheiten den Pantothensäurerest enthielten. Um diese Frage zu klären, wurde CL mit SDS und Harnstoff wie in Abschnitt 4.2.3. beschrieben in Untereinheiten aufgespalten und diese elektrophoretisch getrennt. In diesen getrennten Untereinheiten wurde die in Abb. 51 gezeigte Verteilung der Pantothensäure gefunden.

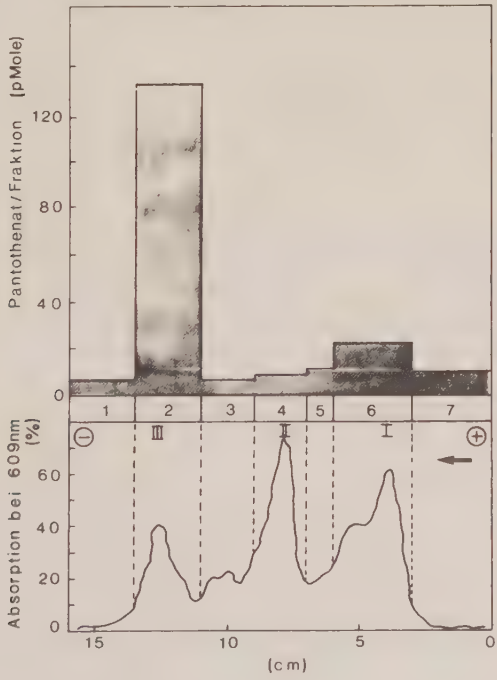


Abb. 51 Bestimmung von Pantothensäure in elektrophoretisch getrennten Untereinheiten der Citrat-Lyase

Legende zu Abb. 51 siehe Seite 110.

Legende zu Abb. 51:

1,5 mg CL wurden nach Denaturierung (1 % SDS, 8 M Harnstoff + 2 mM DTE) auf die 8 Bahnen einer Plattenelektrophorese verteilt und im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Streifen der Platte angefärbt, um die Lage der einzelnen Banden zu bestimmen. Danach wurde entsprechend ausgeschnitten (Abschn. 1-7), das Gel homogenisiert und das Protein mit H_2O bidest. eluiert. Dieses wurde 14 Std. gegen H_2O bidest. dialysiert und dann 3 Std. in 1,0 N KOH hydrolysiert. Nach zwei Fällungen, die eine bei pH 2,0, die andere bei pH 8,5, wurde mit 10 µg alkalische Phosphatase/ml 24 Std. bei 37° C inkubiert. Nach Abstoppen der Phosphatase-Reaktion wurden aliquote Teile in die Wachstumstests eingesetzt und der Pantothenatgehalt der Fraktionen ermittelt. I, II und III sind die densitometrisch bestimmten CL-Banden (s. Legende zu Abb. 33).

Es ist zu sehen, daß der Hauptteil der Pantothensäure im Proteinpeak III nachgewiesen wurde; dieser entsprach der kleinen Untereinheit mit einem MG = 30 500.

Ein kleiner Teil der Pantothensäure war in Peak I (MG = 91 000) lokalisiert, was ebenfalls darauf hindeutete, daß es keine Untereinheit, sondern ein Dimer, bestehend aus Untereinheiten vom MG = 30 500 + MG = 61 000 war.

4.4.4. Radioaktive Markierung der Citrat-Lyase mit 1,5-^{14}C-Citrat

In vorangehenden Kapiteln (2.3.; 4.1.2.) wurde gezeigt, daß die CL aus Rps. gelatinosa, wie das Enzym aus K. aerogenes, ein S-Acetyl-Enzym ist. Der Beweis dafür ist die kovalente Bindung von radioaktivem Acetat durch das Enzym bei der Umsetzung von 1,5-^{14}C-Citrat- Aufgrund des von BUCKEL et al. (1971) nachgewiesenen Reaktionsmechanismus (2.3.) ist die Markierung des Enzyms folgendermaßen zu erklären:

$$\text{Acetyl-S-Enzym} + \text{Citrat} \rightleftharpoons {}^{*}\text{Citroyl-S-Enzym} + \text{Acetat}$$

$$^{*}\text{Citroyl-S-Enzym} \rightleftharpoons {}^{*}\text{Acetyl-S-Enzym} + \text{Oxalacetat}$$

* = Markierung im 5-^{14}C-Citrat.

In Abb. 52 wird der Nachweis für die Bildung von radioaktiver CL während des Umsatzes von markiertem Citrat erbracht. Statt des stereospezifisch markiertem 5-^{14}C-Citrats wurde 1,5-^{14}Citrat verwendet, dies hatte lediglich zur Folge, daß auch das Reaktionsprodukt Oxalacetat markiert wurde. Das quantitative Ergebnis dieses Experiments erscheint in Tab. 19 in Spalte 1.

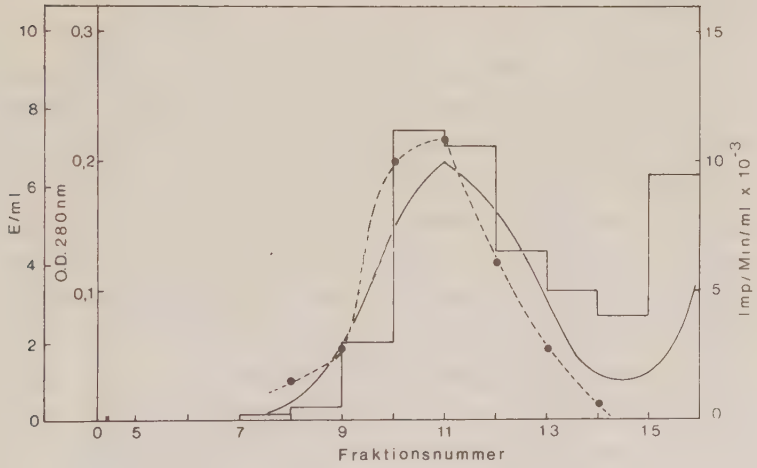


Abb. 52 Beladung der Citrat-Lyase mit C-14 markiertem Citrat

0,2 - 2,2 mg CL wurde nach der in der Legende zu Abb. 53 (4.2.1.) beschriebenen Prozedur reduziert, acetyliert (s. 4.1.1.) und durch Säulenchromatographie von niedermolekularen Bestandteilen befreit (DTE ox. + red., Acetat). Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml genommen. Fraktionen mit einem Proteingehalt (E_{280} 0,05) wurden vereinigt. Nach diesem Schritt wurde die Ausbeute der Enzymeinheiten bestimmt (~60 %) und das Enzym beladen (s. Legende zu Tab. 19). Nun erfolgte erneute Säulenchromatographie (s. Abb. 52). In den einzelnen Fraktionen wurden Protein (E_{280}), Radioaktivität und enzymatische Aktivität bestimmt.

Zeichenerklärung:

——— = Protein
●—●—● = Enzymatische Aktivität; ⎍⎍ = Radioaktivität

Bei diesen Experimenten kam es nicht nur darauf an, zu zeigen, daß die CL grundsätzlich beladbar war, sondern auch nachzuweisen, wieviele Acetylgruppen am Enzym gebunden waren. Dies sollte Aufschluß über die Zahl der Substratbindungsstellen am Enzym geben (Tab. 19). Ähnliche Beladungen wurden auch von MIDDLETON und TUBBS (1974) mit der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase aus Hefe durchgeführt. Dort ist ein Acetyl-S-Enzym Zwischenprodukt in der Biosynthese des 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA.

Aus den in Tab. 19 zusammengestellten Experimenten geht hervor, daß sich die CL aus Rps. gelatinosa über einen bestimmten Grad hinaus, maximal 3 Acetylreste/Molekül, nicht beladen ließ. Weder durch eine, noch weitere Steigerung der Enzymkonzentration, bei 140 Einheiten wurden 52,0 x 10^3 Imp./Min. am Enzym gebunden, noch durch eine Senkung der spezifischen Radioaktivität (Tab. 19, Spalte 4). Beide Maßnahmen waren theoretisch geeignet, eine Verbesserung der Beladungsausbeute zu bewirken. Im ersten Fall durch eine Steigerung des Angebotes an Substratbindungsstellen, im zweiten durch eine Erhöhung der Substratkonzentration, womit verhindert werden sollte, daß nur wenige Enzymmoleküle das Citrat umsetzten. In Enzympräparaten, die vor der Beladung nicht mit DTE reduziert wurden, war unter vergleichbaren Bedingungen, nur ein Bruchteil der Radioaktivität (insgesamt 5 000 Imp./Min.) am Enzym gebunden. Nach der Beladung waren 61 % der eingesetzten Enzymeinheiten direkt meßbar, 68 % nach Acetylierung mit Acetanhydrid, 77 % nach Reduktion mit DTE + Acetylierung mit Acetanhydrid. Durch Inkubation mit inaktivem Citrat (3 mM) konnte das Enzym vollständig entladen werden.

In Kontrollexperimenten mit Citrat-Lyasen aus K. aerogenes und S. diacetilactis wurde keine höhere Beladbarkeit als die in Spalte 1 (Tab. 19) angegebene festgestellt.

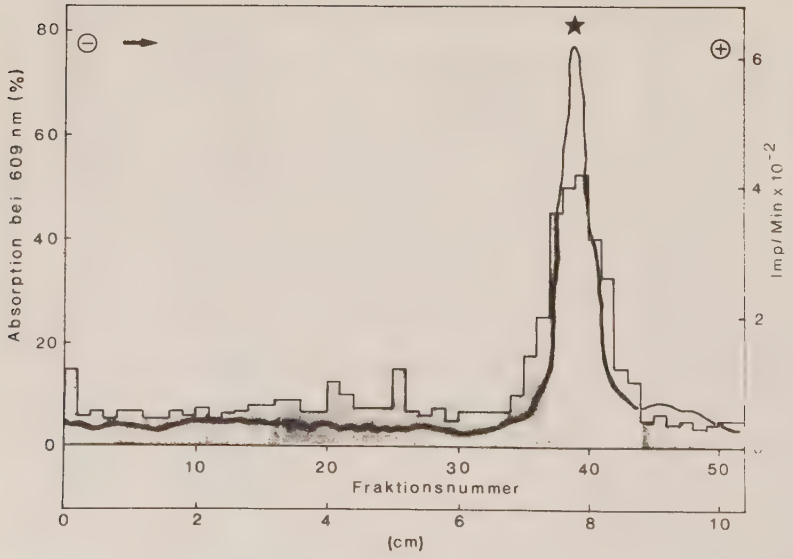
Tab. 19 ^{14}C-Markierung der Citrat-Lyase in Abhängigkeit von der Enzymmenge und der spez. Radioaktivität des Citrats

	Enzymmenge (n Mole)	Enzym-einheiten (E)	1,5-^{14}C-Citrat im Testansatz (μ Mole)	Radioaktivität im Testansatz (Imp./Min.)	Radioaktivität am Enzym gebunden (Imp./Min.)	Acetyl-reste gebunden (n Mole)	Acetylreste / Molekül
1	2,9	102	3,0	$3,6 \times 10^7$	$52,3 \times 10^3$	8,7	3,0
2	1,7	88	3,0	$6,0 \times 10^7$	$51,0 \times 10^3$	5,1	3,0
3	1,0	46	3,6	$13,0 \times 10^7$	$43,5 \times 10^3$	2,4	2,4
4	0,25	11	3,6	$13,0 \times 10^7$	$11,5 \times 10^3$	0,6	2,4
5	1,2	38	15,2	$8,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^3$	2,0	1,6
			2,2 + 13*				

Die Beladung wurde in einem 3 ml Testansatz durchgeführt, der außer den in der Tabelle angegebenen Komponenten enthielt: 100 mM KPO_4, pH 7,2; $NADH_2$, 3,0 mM; MDH, 50 μg.
Die spezifische Radioaktivität des 1,5 C-14-Citrats betrug bei Nr. 1: $1,2 \times 10^7$ Imp./μMol
2: $2,0 \times 10^7$ Imp./μMol
3 + 4: $3,6 \times 10^7$ Imp./μMol
5: $0,5 \times 10^7$ Imp./μMol

* Bei Beladung (5) wurden 13 μMole inaktives Citrat zugesetzt. Citratgehalt und tatsächliche Aktivität des käuflichen C^{14}-Citrats wurden überprüft. In der Berechnung wurden Acetylreste wie 5-C^{14}-Citrat-Moleküle behandelt.
Molekulargewicht der CL in der Berechnung 545 000.

Neben dem Nachweis eines radioaktiv markierten Enzyms durch Gelfiltration an G-25 oder G-200, war dies auch nach Wanderung im elektrischen Feld in Polyacrylamidgelen möglich. Mit dieser Methode konnte gleichzeitig demonstriert werden, daß es sich nicht um lose am Enzym assoziierte Radioaktivität handelte (Abb. 53).



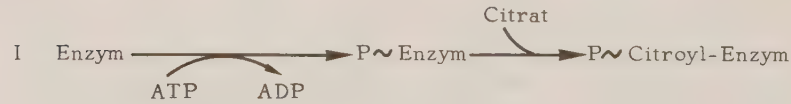
Aus Abb. 53 ist zu ersehen, daß von der eingesetzten CL mit einer Gesamtmarkierung von 3 500 Imp./Min. noch ungefähr 2 000 Imp./Min. in dem Hauptpeak nachweisbar waren. Dieser Verlust an Radioaktivität erklärt sich vermutlich dadurch, daß auch die CL aus Rps. gelatinosa (Acetyl-S-Enzym) einem langsamen Hydrolyseprozeß unterliegt, wie er bereits von BUCKEL et al. (1971) für die CL aus K. aerogenes beschrieben wurde.

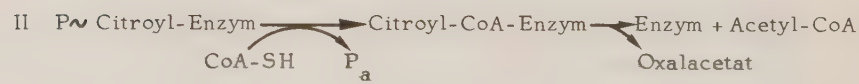
Abb. 53 Disk-Elektrophorese der mit ^{14}C-Citrat beladenen Citrat-Lyase

140 E CL wurden nach Beladung mit 1,5-^{14}C-Citrat (spez. Aktivität = 20,0 x 10^7 Imp./Min./µMol) mit 18 ml gesättigter, eiskalter Ammonsulfatlsg. ausgefällt und 30 Min. bei 30 000 x g abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 1,5 ml Phosphat-Puffer, pH 7,0 + 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen und an einer G-200-Säule (1,5 x 30 cm; 25 cm Füllhöhe) fraktioniert (s. Abb. 52). Fraktionen mit deutlichem Proteingehalt ($E_{280} > 0,05$) wurden vereinigt und auf ein Volumen von 1,4 ml konzentriert (1,8 mg Protein; 52 200 Imp./Min. Enzym gebunden). Von dieser Proteinlösung wurden 30 - 100 µl auf Polyacrylamidgele (Röhrchen) aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt (Durchführung der Elektrophorese und Trennsystem, s. "Methoden" 11.3. sowie 11.2. C und D). Sofort nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Referenzgel angefärbt und densitometrisch ausgewertet (s. Abb. 52), während andere Gele (Proteinmenge max. 180 µg) mittels eines Gelschneiders in 2 mm starke Scheiben aufgeteilt wurden. In diesen Scheiben wurde nach Inkubation mit einem Lösungvermittler Radioaktivität bestimmt (s. "Methoden" 8.). Ausreichende Mengen an Radioaktivität waren nur bei mehr als 100 µg Protein/Röhrchen meßbar.

DISKUSSION

Citrat-Lyase (CL) wurde erstmals 1953 von GILLESPIE und GUNSALUS als Substrat-induzierte Citridesmolase für eine Reihe von homo- und heterofermentativen Milchsäurebakterien beschrieben. Die Autoren konnten nachweisen, daß Acetat und Oxalacetat die Reaktionsprodukte der Citratspaltung waren, und daß die Aktivität der Citrat-Lyase nicht von Coenzym A oder ATP abhängig war. Dieses war der grundlegende Unterschied zur ebenfalls 1953 von SRERE und LIPMAN entdeckten ATP-Citrat-Lyase. Während Citrat-Lyase nur in Bakterien nachgewiesen werden konnte, kommt die ATP-Citrat-Lyase wohl ausschließlich in eukaryotischen Organismen vor (SRERE und LIPMAN, 1953; SRERE, 1959). In der Literatur findet sich nur ein Hinweis, der auf ein Vorkommen eines ATP-abhängigen Enzyms in einem Bakterium hindeutet (TAKAHASHI, 1954), dieser wurde jedoch nie nachgeprüft. Beide Enzyme erfüllen im Stoffwechsel auch eine unterschiedliche Funktion. ATP-Citrat-Lyase spaltet das aus den Mitochondrien stammende Citrat und stellt so Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese zur Verfügung. Wie die Reaktion aller Wahrscheinlichkeit nach abläuft und welchen Wirkungsmechanismus dieses Enzym hat, geht aus den folgenden Gleichungen I und II hervor. Diese basieren auf den Ergebnissen von WALSH und SPECTOR (1969), sowie INOUE et al. (1968).



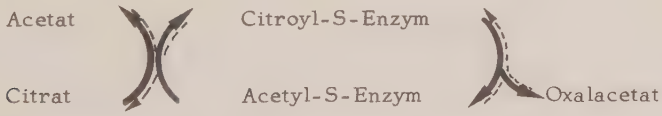


Die ATP-Citrat-Lyase-Reaktion ist reversibel; jedoch wurden in Richtung Citratsynthese nur maximal 5 % der Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion ermittelt (PLOWMAN und CLELAND, 1966). Unter physiologischen Be-

dingungen ist aufgrund der Gleichgewichtslage die Citrat-Spaltung stark begünstigt (INOUE et al., 1968).

Die Citrat-Lyase ist in bestimmten Bakterien das Schlüsselenzym des anaeroben Citratabbaus. Sieht man einmal von Rps. gelatinosa als phototrophen Vertreter ab, resultiert für diese Bakterien der gesamte Energiegewinn aus dem Abbau des Citrats. Meistens wird das bei der Citratspaltung entstehende Oxalacetat über Pyruvat in Acetyl-CoA umgewandelt und dieses für die ATP-Bildung genutzt.

Die Citrat-Lyase-Reaktion ist zwar reversibel (TATE und DATTA, 1965), doch wird unter physiologischen Bedingungen die Citrat-Spaltung stark begünstigt. Die Gleichgewichtskonstante beträgt 3 nach TATE und DATTA (1965) bzw. 2,2 nach GUYNN et al. (1973). Bei dem von BUCKEL et al. (1971) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus für die Citrat-Lyase wird ein Energieaufwand für die Aktivierung des Citrats vermieden, indem das Enzym Energie nur "leihweise" auf das Substrat überträgt, um sie nach erfolgter Reaktion voll zurückzugewinnen (Schema 3).



Die intermediäre Zwischenstufe, das Citroyl-S-Enzym, ist von der Substrat- wie Reaktionsprodukte-Seite energetisch gleich günstig zu erreichen (Gleichgewichtskonstante = 1).

In Anbetracht der Stellung, die beide Lyasen im Stoffwechsel innehaben, ist es von großer Bedeutung, die Aktivität der Enzyme steuern zu können. Die ATP-Citrat-Lyase unterliegt nach Untersuchungen von ATKINSON (1967) einer strengen Kontrolle durch den "energy charge" des Adenylat-

Systems. Das Enzym wird durch ADP gehemmt und ist unter physiologischen Bedingungen voll aktiv, wenn alle Adenylate in Form von ATP vorliegen ("energy charge" = 1). Gemäß dieser Abhängigkeit ist die Lyase nach ATKINSON als ATP-verbrauchendes U-Enzym zu klassifizieren. Ob zusätzlich zum "energy charge" weitere Regulationsmöglichkeiten bestehen, wie z. B. bei der Phosphofructokinase (feed-back Hemmung durch Citrat), ist nicht bekannt.

Das Vorhandensein eines biologischen Regulationsmechanismus in Rps. gelatinosa wurde bereits durch die Arbeiten von GIFFHORN et al. (1972) angezeigt. Die Regulation der Citrat-Lyase besteht aus einer enzymkatalysierten Desacetylierung des Enzyms, die für das Absinken des Levels an aktivem Enzym in der Zelle nach Aufbrauch des Citrats verantwortlich ist (Dissertation GIFFHORN, 1974). Wurde Kulturen von Rps. gelatinosa erneut Citrat zugesetzt, so wurde dieses inaktive Enzym reaktiviert. Dieser kurze Abriß der Regulation der Citrat-Lyase soll an dieser Stelle genügen, weitere Ausführungen sind der Dissertation GIFFHORN vorbehalten. Ein Hinweis auf eine zusätzliche Form der Regulation ist zur Zeit nicht gegeben.

Wie für die Citrat-Lyase aus K. aerogenes beschrieben, läßt sich auch inaktive Citrat-Lyase von Rps. gelatinosa durch Behandlung mit Acetylierungsmitteln wie Acetyl-Imidazol und Acylanhydriden wieder aktivieren. Im Vergleich zu anderen Proteinen ist dies interessant. Bei einer Reihe von Enzymen (z. B. Ribonuclease, α-Amylase, Trypsin) wurden bereits Acetylierungsmittel zur chemischen Modifizierung des Proteins verwendet. Diese chemische Acetylierung verläuft nicht spezifisch. Die Erklärung dafür, daß vorwiegend Aminogruppen acetyliert werden, ist darin zu suchen, daß diese häufig an der Oberfläche der Proteine liegen und deshalb in innigen Kontakt mit dem umgebenden Medium treten können (RIORDAN und VALLEE, 1962). Eine vollständige Acetylierung von Proteinen wurde nur in Ausnahmefällen beobachtet wie beim S-peptid der Ribonuclease nach Be-

handlung mit einem 300fachen Überschuß an Anhydrid; häufiger war ein Acetylierungsgrad, der zwischen 60 und 90 % lag (VITHAYATHIL und RICHARDS, 1960). Von einer Reihe von Autoren wurde mit der Acetylierung des Enzyms einhergehend eine Abnahme der enzymatischen Aktivität beobachtet. Im Falle des Trypsin wurde nach Einführung von 15 Acetylresten pro Molekül eine vollständige Inaktivierung beobachtet (VRATSANOS, 1960), bei der Amylase aus Schweine-Pankreas war nach Acetylierung von 50 % der freien Aminogruppen eine komplette Inaktivierung eingetreten (RADICHEVICH et al., 1959). Experimente von COLMAN und FRIEDEN (1966) zur Acetylierung der Glutamat-Dehydrogenase aus Ochsen-Leber bestätigen dies ebenfalls; sie beobachteten in Gegenwart von 2,1 mM Acetanhydrid einen Aktivitätsverlust von 80 %. Die Autoren konnten zeigen, daß der Aktivitätsverlust durch Modifizierung bestimmter Aminogruppen zustande kam. Eine Modifizierung von Aminogruppen der Ribonuclease aus Rinderpankreas erfolgte nicht in Gegenwart von Substrat oder bestimmten Inhibitoren wie HIRS et al. (1965) zeigen konnten.

Bei diesen vorstehend beschriebenen Enzymen hatten Aminogruppen katalytische Funktion, hingegen üben in der Citrat-Lyase nach BUCKEL et al. (1971) SH-Gruppen diese Funktion aus. Eine Acetylierung von SH-Gruppen ist grundsätzlich nicht schwieriger als die von Aminogruppen; sie wurde auch von COLMAN und FRIEDEN (1966) beschrieben und ist wohl abhängig von der Position dieser Gruppen innerhalb des Proteins. Bei SH-Gruppen, die an der enzymkatalysierten Umsetzung direkt beteiligt sind, ist davon auszugehen, daß sie in einem guten Kontakt zum umgebenden Medium stehen und damit für das Acetylierungsmittel auch leicht erreichbar sind. Der grundlegende Unterschied zwischen der Citrat-Lyase und den anderen vorstehend beschriebenen Enzymen ist jedoch der, daß Citrat-Lyase ein Acetylprotein ist und daß desacetylierte Citrat-Lyase durch Acetylierungsmittel wieder in die aktive Form überführt werden kann. Aus bisher unveröffentlichten Ergebnissen von BUCKEL geht hervor, daß auch die Citramalat-Lyase (EC 4.1.3.22) als Acetyl-S-Enzym vorliegt, und daß

die desacetylierte Form mit Acetanhydrid reaktivierbar ist. Das Enzym befolgt einen Reaktionsmechanismus, der dem der Citrat-Lyase vergleichbar ist.

Wurde Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa mit Acetanhydrid inkubiert, so war es erforderlich, die Anhydridkonzentration der Proteinkonzentration anzupassen. War zuviel Anhydrid vorhanden, so nahm die Aktivität des Enzyms ab. Der Grund hierfür ist möglicherweise eine durch den hohen Acetylierungsgrad erzwungene Konformationsänderung des Proteins. Solche Veränderungen konnten von BETHUNE et al. (1964) bei der Carboxypeptidase gezeigt werden.

Neben Acetanhydrid vermochten auch Propionsäure- und Buttersäureanhydrid die Citrat-Lyase gut zu aktivieren (100 bzw. 82 % bezogen auf Acetanhydrid). Bei längerkettigen Anhydriden war vermutlich infolge einer sterischen Behinderung des Acylrestes nur eine geringere Aktivierung möglich, wobei nicht entschieden werden kann, ob diese Behinderung schon bei der Bindung des Acylrestes am aktiven Zentrum oder erst beim Acylaustausch wirksam wird. In Gegenwart des Substrates Citrat ließ sich die Citrat-Lyase nicht mehr aktivieren; dies ließ darauf schließen, daß Citrat das aktive Zentrum des Enzyms so abschirmte, daß eine nachfolgende Acetylierung nicht mehr möglich war.

Die Aktivierbarkeit der Citrat-Lyase mit Acetanhydrid ließ natürlich die Frage nach dem physiologischen Acetyl-Donator und dem acetylierenden Enzymsystem aufkommen. Sowohl über den Acetyl-Donator als auch über den Aktivierungs-Mechanismus liegen inzwischen Informationen vor. SINGH et al. (1973) isolierten aus zellfreien Extrakten von K. aerogenes ein Enzym, welches eine Acetyl-Gruppe von S-Acetyl-Phosphopanthetein auf die SH-Form der Citrat-Lyase übertrug. Acetyl-CoA wurde von diesen Autoren als Acetyl-Donator ausgeschlossen.

E-SH + S-Acetyl-Phosphopanthetein ⟶ Acetyl-S-Enzym + Phosphopanthetein

(Desacetyl-Citrat-Lyase) ⟶ (Citrat-Lyase)

Kürzlich berichteten SCHMELLENKAMP und EGGERER (1974), daß die Ergebnisse von SINGH et al. (1973) auf unsaubere Präparate zurückzuführen waren und daß in Wirklichkeit Acetat und ATP die Substrate des acetylierenden Enzymsystems sind. Die Bildung der aktiven Lyase erfolgt durch folgende Reaktionen:

I ATP + Acetat $\xrightarrow{\text{Acetat: Enzym Ligase}}$ Acetyl-Adenylat + PP_a

II Acetyl-Adenylat + Desacetyl-Citrat-Lyase $\xrightarrow{\text{Acetat: Enzym Ligase}}$ Citrat-Lyase + AMP

Als eine weitere Eigenschaft, die die Lyasen aus K. aerogenes und Rps. gelatinosa gemeinsam haben, ist ihre Beladbarkeit durch Umsetzung mit radioaktiv markiertem Citrat zu nennen. Wurde Enzym in Substratmengen mit 1,5-^{14}C-Citrat umgesetzt und das Protein anschließend isoliert, so war es radioaktiv markiert. Diese Markierung erklärt sich unter Berücksichtigung des in Schema 3 wiedergegebenen Wirkungsmechanismus durch den Austausch der Acetylreste während der Reaktion. Maximal wurden 3 Mole Acetyl pro Mol Enzym gebunden. Aufgrund der Struktur der Lyase konnten 6 Mole erwartet werden, da 6 Untereinheiten Acyl-Carrier-Funktion haben. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß eine Beladung des Enzyms durch zumindest zwei Faktoren erschwert wurde. In erster Linie durch die Reaktionsinaktivierung, die aus einer Hydrolyse des intermediären Citroyl-Enzyms und damit verbundenem Verlust von Acetylresten resultierte. Als zweiter Faktor kam die erforderliche hohe Enzymkonzen-

tration in Betracht, die wahrscheinlich verhinderte, daß sämtliche Substratbindungsstellen markiertes Citrat umsetzen konnten und somit einer Markierung entgingen. Da die Reaktion bei pH 7,2 durchgeführt wurde (Optimum für die Lyase-Reaktion), kommt eventuell auch eine durch den pH-Wert bedingte geringe chemische Desacetylierung in Betracht. Es konnte gezeigt werden, daß unter den gewählten experimentellen Bedingungen 3 Acetyl-Reste/Molekül einen Maximalwert repräsentierten. Weder durch eine verringerte spez. Radioaktivität, noch durch eine Variation der Enzymkonzentration ließ sich dieser Wert übertreffen. Auch unmittelbar nach der Beladung durch Ammonsulfat-Fällung dem Reaktionsansatz entzogene Citrat-Lyase war nicht höher markiert; damit konnten Austauschreaktionen bis zur Abtrennung der Reaktionsprodukte als Grund für eine geringe Beladungsausbeute ausgeschlossen werden.

Radioaktiv markierte Citrat-Lyase konnte auch nachgewiesen werden, nachdem sie einer Disk-Elektrophorese unterworfen worden war. Wurde radioaktiv markiertes Enzym bei 4° C aufbewahrt, so ging mit einem Verlust an enzymgebundener Radioaktivität ein Aktivitätsverlust einher. Radioaktiv markierte Citrat-Lyase ließ sich durch Inkubation mit inaktivem Citrat "entladen". Die vom Protein abgetrennte Radioaktivität war bei saurem pH-Wert hitzeflüchtig.

Die Aktivierung der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa auf chemischem Wege war Voraussetzung für eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität, da das Enzym nur in inaktiver = desacetylierter Form (SH-Enzym) aus den Zellen isoliert werden konnte. Bedingt durch den Verlust des aktiven Acetylrestes war das Enzym außerordentlich empfindlich gegenüber Luftsauerstoff, da die den Acetylrest tragende SH-Gruppe zum Disulfid oxidiert wurde. Durch die nachfolgende Reduktion konnte das Disulfid zwar weitgehend zum SH reduziert werden, was aber sicherlich nicht vollständig gelang. Dieser Umstand ist wohl auch zu berücksichtigen, wenn nach der Erklärung für die recht geringe Ausbeute von 7 % bei der Anreicherung des En-

zyms gesucht wird. Bei der Anreicherung lag ein grundlegender Unterschied zu dem K. aerogenes-System vor, wo es möglich war, das aktive Enzym anzureichern.

Enzymatisch aktive Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa zeigte auch Thioester-Eigenschaften, indem sie ebenfalls inaktivierte, wenn sie mit Hydroxylamin oder Mercaptanen in höheren Konzentrationen (> 3 mM) inkubiert wurde. Wenn durch Mercaptan-Behandlung inaktivierte Citrat-Lyase von diesem durch Dialyse oder G-25-Chromatographie befreit worden war, ließ sie sich anschließend mit Acetanhydrid zu etwa 90 % reaktivieren. Eine weitere Form von Inaktivierung der Citrat-Lyase wurde bei Inkubation des Enzyms mit Oxalacetat und Mg^{2+}-Ionen beobachtet. Der Grad der Inaktivierung war abhängig von der Mg^{2+}-Konzentration. Ohne Mg^{2+} hatte Oxalacetat keinen inaktivierenden Einfluß. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den von SINGH und SRERE (1971) sowie BUCKEL et al. (1971) berichteten. Als Erklärung für die Inaktivierung scheidet eine Konformationsänderung des Enzyms, induziert durch Bindung des Oxalacetats, nach Untersuchungen von SINGH und SRERE (1972) aus. Ebenso ließ sich ihre Beobachtung, daß das inaktivierte Enzym nur halb so groß war wie das aktive, nicht als sinnvolle Erklärung für die Inaktivierung verwenden. BUCKEL und Co-Autoren zeigten, daß Inkubation mit Oxalacetat (+ Me^{2+}) eine Ablösung des aktiven Acetylrestes der Citrat-Lyase bewirkte, der durch anschließende Acetylierung mit Acetanhydrid wieder in das aktive Zentrum eingeführt werden konnte und damit zu 65 - 70 % wieder aktives Enzym lieferte.

Einen ähnlichen Einfluß auf die aktive Citrat-Lyase wie die oben genannten Verbindungen hatte ein alkalischer pH-Wert. Bei pH 8,0 und 30° C aufbewahrtes Enzym war bereits nach wenigen Minuten zum größten Teil inaktiv. Auch hier konnte durch Absenken des pH-Wertes zum Neutralpunkt und anschließende Acetylierung das Enzym reaktiviert werden. Damit bot sich als Erklärung auch für diese Inaktivierung der Citrat-Lyase eine Abspaltung

des aktiven Acetylrestes (Desacetylierung) an.

Gegen einen Zerfall in Proteinuntereinheiten und damit verbundener Inaktivierung sprach einerseits die Reversibilität der vorstehend geschilderten Prozesse, und daß ein solcher Zerfall mit geeigneten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte. Desacetylierte und acetylierte Citrat-Lyase bandierten z. B. in einer normalen Disk-Elektrophorese genau an der gleichen Stelle mit nur einer Bande. Lediglich in gealterten, bei -18° C über einen längeren Zeitraum aufbewahrten Citrat-Lyase-Präparaten wurde ein spontaner Zerfall in Proteinuntereinheiten beobachtet. Hier war dann auch die Reaktivierbarkeit bereits deutlich herabgesetzt.

Eine weitere Form der Inaktivierung deutete sich bereits in der Reaktionskinetik der Citrat-Lyase an. Die Substratumsetzung war nur zu Beginn der Reaktion linear (etwa 30 - 120 Sek.) und knickte dann ab, was eine Herabsetzung der Umsetzungsgeschwindigkeit anzeigte. Dieses ungewöhnliche Verhalten wurde bereits für die Citrat-Lyase aus K. aerogenes von SRERE (1970) treffend als "suicide" gekennzeichnet und unter dem Begriff Reaktionsinaktivierung in die Literatur eingeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieses Autors wurde bei Inkubation der Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa mit dem Substrat Citrat und bestimmten Metallionen, wie Mg^{2+}, Mn^{2+} und Co^{2+}, eine Reaktionsinaktivierung beobachtet. Das Ausmaß dieser Reaktionsinaktivierung war abhängig von der Konzentration, in der diese Ionen eingesetzt wurden. In entsprechenden Experimenten mit Mg^{2+} konnte gezeigt werden, daß bei einer Konzentration von 2 mM Mg^{2+} das Enzym bei zweimaligem Umsatz von 300 nano Molen Citrat nur zu etwa 20 % reaktionsinaktivierte, während bei Mg^{2+}-Konzentrationen darunter und darüber bis zu 80 % Reaktionsinaktivierung auftraten. Wurde Mg^{2+} durch Zn^{2+} oder Ni^{2+} ersetzt, so trat keine Reaktionsinaktivierung auf, was darauf hindeutete, daß auch die Natur des Metallions eine Rolle spielte.

Es erhob sich natürlich die Frage, ob dieses Phänomen Reaktionsinaktivierung eine Bedeutung für die Regulation der Citrat-Lyase in der Zelle besaß. Letzteres konnte bislang noch für keine der untersuchten Lyasen bestätigt werden. Vielmehr scheint es so zu sein, daß durch diese Reaktionsinaktivierung lediglich der Punkt angezeigt wird, an dem die Regulation des Enzyms in der Zelle angreift, an dem aktiven Acetylrest. So erklärten BUCKEL et al. (1971) die Reaktionsinaktivierung als Folge der Hydrolyse des intermediären Citroyl-S-Enzyms, was einen Verlust des Acetylrestes bedeutet. Das desacetylierte Enzym zeigte sich gegenüber Jodessigsäure empfindlich und lieferte unreaktivierbares Enzym-S-CH_2CO_2H, dagegen war es im enzymatisch aktiven Enzym als Thioester geschützt und wurde nicht carboxymethyliert.

Im folgenden sind einige Punkte zusammengestellt, die die inaktive Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa als SH-Enzym klassifizieren:

1. Abnahme der Acetylierbarkeit bei gealterten Enzympräparaten, die dem Luftsauerstoff zugänglich waren.

2. Verbesserung der Acetylierung durch vorherige Inkubation des Enzyms mit SH-Verbindungen wie DTE und DTT.

3. Nachweis von 21 frei titrierbaren SH-Gruppen.

4. Vollständige Blockierung der SH-Gruppen mit Jodessigsäure.

Daß aktive Citrat-Lyase ein Acetyl-S-Enzym ist, wurde durch folgende Ergebnisse belegt:

1. Aktivierung des inaktiven SH-Enzyms durch Inkubation mit Acetylierungsmitteln wie Acetyl-Imidazol und Acetanhydrid.

2. Markierung des Enzyms durch Bindung eines radioaktiven Acetylrestes.

3. Inaktivierung der Citrat-Lyase durch chemische Desacetylierung.

Die Umwandlung der Citrat-Lyase in aktive und inaktive Form ist damit vom Prinzip der chemischen Modifizierung her vergleichbar mit der an der Glutamin-Synthetase beobachteten. Dieses Enzym kommt ebenfalls in der Zelle in zwei Zustandsformen vor, in einer inaktiven = adenylylierten und einer aktiven = desadenylylierten Form (KINGDON et al., 1967; SHAPIRO, 1969) und kann je nach Stoffwechsellage von geeigneten Enzymen in eine der beiden Formen überführt werden.

Die Citrat-Lyase wurde aus zellfreien Extrakten von Rps. gelatinosa zur Homogenität angereichert. Diese wurde durch Elektrophorese und Ultrazentrifugations-Experimente bewiesen. Da zahlreiche Untersuchungen zum im folgenden zu diskutierenden Aufbau des Enzyms das Vorliegen von Enzympräparaten unbedingt voraussetzten, wurde diesen Experimenten ein großes Gewicht beigemessen. Erst nachdem bewiesen war, daß Citrat-Lyase-Präparate kein Fremdprotein mehr enthielten, wurden Experimente wie SDS-Elektrophorese, Ultrazentrifugation und Bestimmung von SH-Gruppen durchgeführt. Der Diskussion der Ergebnisse soll eine Tabelle vorangestellt werden, die Aufschluß darüber gibt, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus der Literatur über die bisher am besten untersuchte Citrat-Lyase aus K. aerogenes bekannt ist (Tab. 20).

Tab. 20 Molekulargewichte und S-Werte der Citrat-Lyase (K. aerogenes) sowie ihrer "Untereinheiten" nach Literaturangaben

Nr.	Methode	MG	$S^{\circ}_{20,W}$	Anzahl Untereinheiten	MG Untereinheiten	$S^{\circ}_{20,W}$ Untereinheiten
1	UZ	314 000 - 318 000	16,2	-	-	-
2	UZ	575 000	16,0	8 identische	273 000 (2 x) ↓ 137 000 (4 x) ↓ 73 000 (8 x)	10,3 ↓ 6,3 ↓ 2,0
2a	Gelfil-filtration	< 2 000 000 und > 483 000	-	-	-	-
3	UZ	570 000 573 000	-	-	-	-
4	UZ + SDS-Elektro-phorese	533 000 - 566 000	17,6	16 identische	275 000 (2 x) ↓ 137 000 (4 x) ↘ 72 000 (8 x) ↓ 34 000 (16 x)	10,0 ↓ 6,2 ↓ - ↓ 2,1
5	SDS-Elektro-phorese	550 000 von 2 und 3 übernommen	-	16 identische + 4 ACP	137 000 (4 x) ↙ ↘ 10 000 + 127 000 (4 x) ↓ 31 000 (16 x)	-

Legende zu Tabelle 20 siehe Seite 128.

Legende zu Tab. 20:

Mit 1- 5 wurden folgende Literaturstellen bzw. Autoren gekennzeichnet: 1, BOWEN und ROGERS (1963); 2 und 2a, MAHADIK und SIVA RAMAN (1968); 3, BOWEN und MORTIMER (1970); 4, BOWEN und MORTIMER (1971); 5, DIMROTH et al. (1973).

Die Bezeichnung Untereinheiten ist streng genommen nur für das kleinste Bruchstück korrekt.

(nx) gibt an, wieviele solcher Bruchstücke vorhanden sind.

Vergleicht man die aus der Tabelle 20 zu entnehmenden Molekulargewichte für das Gesamtmolekül mit dem für die Citrat-Lyase ermittelten von 545 000 (≙ einem Mittelwert aus UZ, 529 000 und Gelfiltration, 560 000), so ist eine recht gute Übereinstimmung festzustellen. Lediglich das in Spalte 1 angegebene Molekulargewicht (314 000) fällt dabei aus dem Rahmen. Dieses Ergebnis wurde von BOWEN und MORTIMER (1970) korrigiert, da sich herausgestellt hatte, daß dieser niedrige Wert durch teilweise Dissoziation der Citrat-Lyase in Abwesenheit von Mg^{2+} hervorgerufen worden war. In Gegenwart von stabilisierendem Mg^{2+} erhielten die Autoren ein Molekulargewicht von 570 000. Dieser Übereinstimmung im Molekulargewicht beider Lyasen stehen jedoch größere Unterschiede im Aufbau der Enzyme gegenüber.

Ultrazentrifugation der Citrat-Lyase aus K. aerogenes in Gegenwart von SDS oder Harnstoff ergab Molekulargewichte für die Untereinheiten, die zu dem Molekulargewicht des Enzyms in Relation gesetzt, als Gesamtzahl der Untereinheiten stets ein Vielfaches von vier ergaben (Tab. 20). Die niedrigste Zahl von Untereinheiten, nämlich 8, wurde von MAHADIK und SIVA RAMAN (1968) angegeben. Sie verwendeten, im Gegensatz zu den anderen Autoren, bei der Dissoziation der Citrat-Lyase keine SH-Verbindungen wie 2-Mercaptoäthanol oder DTE zur Erzielung von reduzierten Bedingungen. Der von ihnen angegebene Wert von 73 000 als Molekulargewicht für die kleinste Untereinheit scheint daher eher dem Molekulargewicht eines Dimers aus zwei Polypeptidketten zu entsprechen. Dafür spre-

chen auch Ergebnisse von BOWEN und MORTIMER (1971), die in 6 M Guanidin-hydrochlorid, in Abwesenheit von Mercaptoäthanol, ebenfalls Dimere mit einem MG = 72 000 erhielten. Die Entstehung dieser Dimere war unter den von den Autoren angewendeten Bedingungen auf zwei verschiedenen Weisen möglich:

a) Unter der Annahme, daß die Polypeptidketten im Protein nur nicht-kovalent miteinander verbunden waren, konnten diese nach der Trennung durch Ausbildung von S-S-Brücken wieder reaggregieren, da keine Vorkehrungen getroffen worden waren, um diese Disulfide zu reduzieren.

b) Die einzelnen Polypeptidketten wurden durch nicht-kovalente und kovalente Bindungen im Protein zusammengehalten. Ein Beispiel hierfür liefert der Insulin-Monomer, welcher aus zwei Polypeptidketten besteht, die durch intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind (SANGER, 1949). In einem solchen Fall konnten nur die nicht-kovalenten Bindungen durch Harnstoff oder SDS gelöst werden, während für das Lösen der Disulfid-Bindung eine Reduktion oder Oxidation (z. B. Perameisensäure) erforderlich war.

BOWEN und MORTIMER (1971) gelang es tatsächlich, diese Dimere unter reduzierten Bedingungen in zwei Polypeptidketten aufzuspalten, was bedeutete, daß die CL aus 16 Untereinheiten zu je einer Polypeptidkette bestand. Dieser Befund hat auch heute noch Gültigkeit, wenn auch nur mit einer auf DIMROTH et al. (1973) zurückgehenden Ergänzung. Diese Autoren zeigten durch SDS-Elektrophorese, daß zusätzlich noch vier kleinere Polypeptidketten (MG ~ 10 000) vorhanden waren. Diese tragen den aktiven Acetylrest und wurden von ihnen Acetyl-Carrier-Proteine (ACP) genannt. Aufgrund ihrer experimentellen Ergebnisse postulierten sie, daß ein ACP (MG = 10 000) und 4 Untereinheiten (MG ~ 31 000) in Form eines Pentamers die kleinste funktionelle Einheit bildeten. Daraus wiederum resultiert nach

ihrer Ansicht, daß der native Gesamtkomplex Citrat-Lyase in Form eines Tetramers aus diesen Pentameren aufgebaut wird.

SDS-Elektrophorese der Citrat-Lyase von Rps. gelatinosa erbrachte zwei - und wenn nicht genügend reduziert wurde - drei Proteinbanden, denen Molekulargewichte von 30 500, 61 000 und 97 000 entsprachen. In Gegenwart von 3 mM DTE verschwand die Bande mit MG = 97 000, und es trat keine neue neben den beiden mit geringerem MG auf. In Ultrazentrifugations-Experimenten mit dissoziierter Citrat-Lyase wurden ebenfalls in Abwesenheit von SH-Verbindungen Untereinheiten beobachtet, denen ein MG von 95 000 zukam. Es war ziemlich wahrscheinlich, daß diese "Untereinheiten" (MG = 95 000 - 97 000) aus je einer Polypeptidkette mit MG = 30 500 und einer mit MG = 61 000 bestanden. Für die Dissoziation des Enzyms konnte daraus geschlossen werden, daß sie wohl in zwei Stufen erfolgte. In der ersten Stufe dissoziierte das Enzym relativ leicht (nicht kovalente Bindungen!) in die Dimere. Die zweite Stufe der Dissoziation, in der die Dimere in die nativen Polypeptide aufspalteten, war erschwert durch das Vorhandensein von S-S-Brücken zwischen den Polypeptiden. Diese kovalente Bindung konnte erst durch Reduktion gelöst werden. Neben den drei oben beschriebenen Banden trat in der SDS-Elektrophorese keine weitere auf. Das heißt auch: Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa enthält kein ACP von MG = 10 000, wie es von DIMROTH et al. (1973) für die Citrat-Lyase aus K. aerogenes nachgewiesen wurde. Es konnte aber gezeigt werden, daß nur die Untereinheiten mit einem MG von 30 500 Pantothenat enthielten und damit als Träger des aktiven Acetylrestes in Frage kamen. Dies bedeutete, daß sie die Funktion des ACP vom K. aerogenes-Enzym mit wahrnahmen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Citrat-Lyase von Rps. gelatinosa und Analysen solcher Aufnahmen mit Hilfe der Markham-Rotation zeigten, daß die Lyase aus zwölf Untereinheiten besteht, die in Form zweier übereinander liegender, hexagonaler Ringe um einen zentralen, optisch

leeren Raum angeordnet sind. Dieser Aufbau ähnelt dem von VALENTINE et al. (1968) für die Glutamin-Synthetase von E. coli beschriebenen. Im Unterschied zur Glutamin-Synthetase, die aus zwölf identischen Untereinheiten besteht, enthält die Citrat-Lyase zwei verschiedene Typen von Untereinheiten (s. o.), die in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 beobachtet wurden. Bedingt durch das begrenzte Auflösungsvermögen der elektronenmikroskopischen Präparationsmethode konnte zwischen Untereinheiten verschiedener Größe nicht unterschieden werden. Hier mußten die Ergebnisse der SDS-Elektrophorese herangezogen werden. Jedoch ließen sich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen folgende Dimensionen ausmessen und zur Konstruktion eines Modelles heranziehen. Abb. 54 zeigt ein Modell der Citrat-Lyase, das mit den erhaltenen elektronenmikroskopischen und biochemischen Daten übereinstimmt.

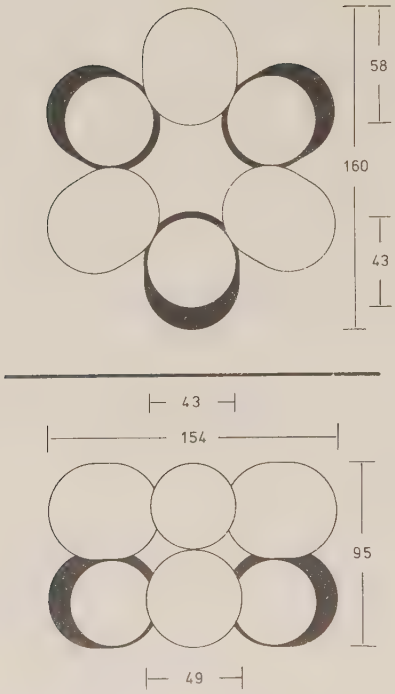


Abb. 54 Modell der Citrat-Lyase von Rps. gelatinosa

Im oberen Teil der Abbildung ist das Molekül in der Aufsicht, im unteren Teil in der Seitenansicht dargestellt. Die Zahlenangaben sind Angström-Einheiten. In der Aufsicht sind alternierend große und kleine Untereinheiten des oberen Ringes (weiß) zu erkennen. Vom unteren Ring sind nur die großen Untereinheiten (schwarz) zu sehen, da die kleinen von den großen Untereinheiten des oberen Ringes vollständig maskiert werden. In der Seitenansicht ist die Doppel-Ringstruktur des Moleküls erkennbar.

In der Aufsicht hat die nicht exakt ringförmige Struktur zwei verschiedene Durchmesser von 160 und 154 Å. In der Seitenansicht beträgt die Dicke der beiden übereinanderliegenden Ringe etwa 95 Å. Die Markham-Rotation zeigte, daß eine senkrechte Projektion der großen Untereinheit (MG = 61 000) eine Ellipse ergab, mit Axen von 58 und 49 Å. Eine Information über die Abmessungen der kleinen Untereinheit (MG - 30 500) war aufgrund der Struktur der Citrat-Lyase nicht zu erlangen. Die Erklärung liegt in einem maskierenden Effekt der großen Untereinheit, welcher der Erläuterung bedarf.

Um die in der Seitenansicht (Abb. 54) angegebene Höhe von 95 Å durchgehend einzuhalten, ist zu fordern, daß je eine große und eine kleine Untereinheit übereinanderliegen, was wiederum bedeutet, daß in den beiden Ringen eine alternierende Folge von großen und kleinen Untereinheiten vorliegt. Nur diese Anordnung garantiert ein nahtloses Aneinanderfügen beider Ringe, und sie erklärt, weshalb bei senkrechter und seitlicher Projektion nur die großen Untereinheiten erkennbar sind. In diesem Licht erscheint auch das Auftreten der Dimere (MG = 97 000) in der SDS-Elektrophorese und der Ultrazentrifuge erklärlich, da demzufolge in senkrechter Richtung wahrscheinlich ein stärkerer Zusammenhalt (kovalente Bindung!) ausgebildet ist als in waagerechter. Es wäre möglich, daß diese Dimere so etwas wie eine funktionelle Einheit darstellen.

Mit Hilfe der für die große Untereinheit bestimmten Abmessungen, konnte ihr Volumen und ihr Molekulargewicht bestimmt werden. Unter der Annahme einer etwas idealisierten Gestalt, bestehend aus zwei Halbkugeln mit zusammen 49 Å Durchmesser und einem zwischengesetzten Zylinder mit 9 Å Höhe und 49 Å Durchmesser, beläuft sich das Volumen der großen Untereinheit auf 80 900 $Å^3$. Auf der Basis einer Volumen/Molekulargewicht Relation, wie sie von ZIPPER et al. (1971) angegeben wurde (1,37 $\pm$ 0,12 $Å^3$/Dalton für globuläre Proteine), resultiert ein Molekulargewicht von 59 000. Dieser Wert liegt nahe dem durch SDS-Elektrophorese er-

mittelten (61 000). Da über die kleine Untereinheit durch die Elektronenmikroskopie keine Information bezüglich ihrer Gestalt erhalten wurde, mußten hier entsprechende Berechnungen unter der Annahme einer sphärischen Gestalt durchgeführt werden. Unter Berücksichtigung des in der SDS-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichts von 30 500 ergab sich ein Volumen von 41 000 $Å^3$, was einen Durchmesser für diese Untereinheit von 43 Å bedingt. Dieser Wert wurde auch in dem Modell verwendet.

Auf elektronenmikroskopischen Photographien der Citrat-Lyase wurden vereinzelt Strukturen beobachtet, die bislang mit der oben entwickelten Modellvorstellung nicht so recht in Einklang zu bringen sind. Es handelt sich dabei um die als "Dreierstrukturen" bezeichneten Moleküle, welche in der charakteristischen Form eines Mercedes-Sterns angeordnet sind. Ähnliche Proteinmoleküle mit einer solchen Dreifach-Symmetrie wurden auch von HORNE und GREVILLE (1963) auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Glutamat-Dehydrogenase aus Ochsenleber beobachtet. Sie erklärten sich die Entstehung dieser Strukturen als ein "Maskierung" tieferliegender Untereinheiten durch das Kontrastierungsmittel. Dies setzt allerdings eine Anordnung der Untereinheiten in Form eines Tetraeders voraus, während in der Citrat-Lyase die Untereinheiten einen ebenen Ring bilden. Eine andere Möglichkeit der Erklärung dieser Mercedes-Sterne wäre, daß es sich um Reaggregationen großer Untereinheiten (MG - 61 000) handelt, die aus Citrat-Lyase-Molekülen heraussegregiert waren. Solche unvollständigen Moleküle, in denen 1 - 3 Untereinheiten fehlten, wurden häufig beobachtet.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In zellfreien Extrakten von Rhodopseudomonas gelatinosa lag Citrat-Lyase größtenteils desacetyliert und oxidiert vor. Es wurde ein Reaktivierungstest ausgearbeitet, in dem mit Dithiothreitol als Reduktionsmittel und Acetylimidazol oder Acetanhydrid als Acetylierungsmittel enzymatisch aktive Citrat-Lyase in hoher Ausbeute aus der inaktiven Form gewonnen wurde.

2. Die Citrat-Lyase wurde durch Ultrafiltration, Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration in der inaktiven Form (SH-Enzym) 43fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 139 E/mg angereichert. Die Ausbeute bei diesem Anreicherungsverfahren betrug etwa 7 %. Das erzielte Enzympräparat war nach den Kriterien der Polyacrylamid-Elektrophorese und der analytischen Ultrazentrifuge homogen.

3. Durch Inkubation mit Oxalacetat oder Citrat wurde Citrat-Lyase reaktionsinaktiviert. Das Ausmaß dieser Inaktivierung war abhängig von Art und Konzentration der verwendeten Metallionen. In Gegenwart von Mg^{2+}-, Mn^{2+}- oder Co^{2+}-Ionen inaktivierte das Enzym, während Zn^{2+}- oder Ni^{2+}-Ionen keinen inaktivierenden Einfluß zeigten. Bei 2 mM Mg^{2+}-Konzentration war die Reaktionsinaktivierung am geringsten, während sie in niedrigeren und höheren Konzentrationen deutlich zunahm.

4. Die Citrat-Lyase hatte ein obligates Bedürfnis für zweiwertige Metallionen. Die Aktivität des Enzyms nahm, bei Verwendung verschiedener Metallionen in optimaler Konzentration, in der Reihenfolge Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} und Ni^{2+} ab. Der optimale pH-Bereich für die Citrat-Spaltung lag zwischen 7,2 und 7,4. Als K_m-Werte wurden für Citrat 0,17 mM und für Mg^{2+} 0,33 mM ermittelt. Bei Mg^{2+}-Konzentrationen größer als 3 mM wurde die Citrat-Lyase durch Mg^{2+} kompetitiv gehemmt.

5. Für das Enzym ergab sich als Mittelwert aus verschiedenen Bestimmungsmethoden (Ultrazentrifugation, Gelfiltration) ein Molekulargewicht von 545 000 Dalton. Die zugehörigen Sedimentationskonstanten wurden in der analytischen Ultrazentrifuge mit 14,7 und im Dichtegradienten mit 15,3 bestimmt. Durch elektronenoptische Aufnahmen wurde gezeigt, daß das Citrat-Lyase-Molekül aus zwei übereinanderliegenden Ringen bestand, die ihrerseits von je 6 Untereinheiten gebildet wurden. Die Durchmesser des Gesamtmoleküls waren 154 bzw. 160 Å, die Durchmesser der erkennbaren Untereinheiten 58 bzw. 49 Å.

   Durch Behandlung mit 1 % SDS oder 8 M Harnstoff dissoziierte das Enzym unter reduzierten Bedingungen in nicht identische Untereinheiten mit Molekulargewichten von 30 500 und 61 000 Dalton. Diese traten in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 auf. Eine entsprechend einem Molekulargewicht von 97 000 Dalton auftretende Proteinbande wurde als Dimer der zuvor beschriebenen Untereinheiten erkannt.

6. Unter Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse bezüglich der Struktur ergab sich, daß 6 Untereinheiten mit einem MG = 30 500 Dalton und 6 Untereinheiten mit einem MG = 61 000 Dalton das Gesamtmolekül bildeten. Sie waren alternierend innerhalb der Ringe angeordnet.

7. Nur Untereinheiten mit einem MG = 30 500 enthielten 4-Phosphopantothein. Als Gesamtgehalt an 4-Phosphopantothein wurden 3 - 3,5 Mole pro Mol Enzym bestimmt.

8. Durch Umsetzung von 5-^{14}C-Citrat wurde die Citrat-Lyase radioaktiv markiert. Maximal drei Acetylreste wurden an ein Enzymmolekül gebunden.

METHODEN

1. Organismen

Rhodopseudomonas gelatinosa, Stamm 149, wurde aus der Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen bezogen.

Lactobacillus plantarum, Stamm DSM 20205, stammte aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, München.

2. Kulturmedium

Nährlösung

KH_2PO_4	1,0	g
NH_4Cl	0,4	g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,05	g
Tri-Natriumcitrat	5,0	g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,4	g
NaCl	0,4	g
Hefeextrakt	0,5	g
H_2O bidest.	ad 1 000	ml

Spurenelementlösung SL 4

10fach konzentriert; 1 ml pro Liter.

Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt.

Schwermetalllösung SL 4

Destilliertes Wasser	1 000 ml
Äthylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)	500 mg
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	200 mg
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	20 mg
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	1 mg
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	2 mg
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	3 mg

pH: 3 - 4

Anwendung: 10 ml je Liter Kulturmedium

3. Anzucht und Ernte der Zellen

Vorkulturen von Rps. gelatinosa wurden in 100 bzw. 500 ml Schraubdeckelflaschen in obiger Nährlösung bei 28° C und 3 000 Lux herangezogen. Reinheitsprüfungen wurden aerob im Dunkeln und anaerob im Licht auf Agarplatten durchgeführt. Massenkulturen wurden in 5, 10 und 20 l Steilbrustflaschen durchgeführt, dabei erwies sich in Bezug auf optimale Citrat-Lyase-Ausbeute folgendes Anzuchtverfahren als besonders effektiv:

1. Ausgangsmaterial: 2 x 500 ml, 24 Stunden bei 28° C - 30° C und 3 000 Lux angezogen.
2. Vor-Vorkultur: 1 x 5 l; Kulturbedingungen wie unter 1.; angezogen auf einem Magnetrührwerk.
3. Vorkultur: 2 x 10 l; Bedingungen wie unter 2.

4. Hauptkultur: 6 x 20 l; 36 Stunden bei 28 - 30° C und 3 000 Lux. Die Hauptkultur wurde nach 24 Stunden mit 1,5 l Konzentrat der kompletten Nährlösung nachgefüttert.

Die optische Dichte der Kulturen wurde am Zeiss PM 4 Spektralphotometer bei 650 nm und 1 cm Lichtweg gemessen. Die Kulturen wurden bei Extinktionswerten von 0,6 geerntet. Die Ernte der Zellen erfolgte mittels einer Durchlaufzentrifuge (Cepa, Firma C. Padberg, Lahr/Baden). Die auf diese Weise erhaltene Zellpaste wurde in 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurde in der Zeta 20 (Firma Heraeus-Christ GmbH, Osterode/Harz) bei 8 000 x g und 4° C 30 Minuten abzentrifugiert.

4. Herstellung zellfreier Extrakte

a) Da sich während der Untersuchungen zeigte, daß die Aufbewahrung von Rps. gelatinosa (gefroren oder lyophilisiert bei -20° C) eine Verminderung der Citrat-Lyase-Aktivität bewirkte, wurden zellfreie Extrakte für die Enzymanreicherung aus frisch geernteten Zellen hergestellt. Demzufolge wurde die gesamte Ausbeute einer Anzucht - etwa 270 g - in 500 ml 75 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 mit 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen und in einer verschlossenen Glasflasche bei 4° C über Nacht gerührt. Diese Suspension wurde dann in 40 ml Portionen in eine auf 4° C vorgekühlte French-Presse (American Instrument Comp. Inc., Maryland) gegeben und einmal mit max. Druck von 80 kp/cm^2 durchgepreßt. 30 Min. Zentrifugation bei 20 000 x g in der Zeta 20 lieferte einen von Zellen und Zelltrümmern freien Rohextrakt.

b) Frische oder konservierte Zellen (tiefgefroren oder lyophilisiert) wurden in Mengen von 2 - 4 g Feuchtgewicht in 5 - 15 ml Puffer (Tris-HCl, TEA, Phosphat, pH 7,4; je 0,1 M) suspendiert. Nach Homogenisierung

wurde in 30 Sek. Intervallen bis zu 8 Minuten mit dem Ultraschall-Desintegrator (Firma Schoeller & Co., Frankfurt; 250 Watt, 20 KHz) aufgeschlossen. Eine Temperatur von max. +4° C wurde durch Kühlung mittels eines Kryomaten (Ultra-Kryomat TK-30 D; Meßgeräte-Werk Lauda) nicht überschritten. Anschließend Zentrifugation wie unter a).

c) 2 g Zellen (s. o.) wurden in 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 gelöst und zehn Minuten bei Zimmertemperatur mit 20 % Sucrose und 1 mM EDTA gerührt. Danach wurde auf 4° C abgekühlt und bei dieser Temperatur 20 Minuten zentrifugiert (20 000 x g). Das Pellet wurde in 9 ml eiskaltem H_2O bidest. aufgenommen. Nach zehn Minuten wurde 1,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,6 zur Stabilisierung zugesetzt. Anschließend zentrifugiert wie unter a).

d) Zu 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in denen 2 g feuchte Zellen suspendiert worden waren, wurde unter Rühren 0,1 ml Lysozymlösung (40 mg/ml) und 0,1 ml Polymyxin B-Lösung (80 mg/ml) zugetropft. Nach 5 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde 0,1 ml DNase-Lösung (0,2 mg/ml) hinzugesetzt und weitere 15 Minuten inkubiert. Daran schlossen sich nochmalige Inkubation (1 Stunde bei 4° C) und Zentrifugation wie unter a) an. Die gleiche Prozedur wurde auch mit fünffacher Konzentration der Zusätze und doppelten Inkubationszeiten durchgeführt. In weiteren Experimenten wurde Polymyxin B durch 10 mM EDTA ersetzt.

5. Proteinbestimmung

Vor der quantitativen Bestimmung wurde das Protein ausgefällt. Bei der Fällung wurde nach zwei verschiedenen Methoden verfahren; jeweils 0,1 ml Proteinlösung.

a) Gefärbte Proteinlösungen (z. B. Rohextrakt und Fraktionen aus frühen Anreicherungsschritten) wurden mit 2,5 ml Aceton zur Extraktion der Pigmente versetzt.

b) Aus ungefärbten Proteinlösungen wurde mit 0,1 ml 3 M Trichloressigsäure ausgefällt.

Das Protein wurde in einer Laborzentrifuge (Junior II der Firma Heraeus-Christ, Osterode/Harz) 15 Min. bei 4 000 U/Min. abzentrifugiert.

Methode modifiziert nach LOWRY et al. (1951)

Reagenz I
100 ml 3 % Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH
1 ml 2 % K - Na - Tartrat
1 ml 1 % $CuSO_4 \times 5\ H_2O$

Das Reagenz I wurde kurz vor der Bestimmung aus den Stammlösungen erstellt.

Reagenz II
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Firma Merck, Art. Nr. 9001), 1 : 3 verdünnt eingesetzt.

Das Proteinpräzipitat (s. o. a, b) wurde in 0,5 ml H_2O aufgenommen, 5 ml Reagenz I hinzugefügt und 10 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurden 0,5 ml verdünntes Reagenz II hinzugegeben, durchgemischt und nach 30 Min. bei 660 nm gegen einen Leerwert die Extinktion gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard (20 - 200 µg) ermittelt.

Biuret-Methode nach BEISENHERZ et al. (1953)

Biuretreagenz:
9 g K-Na-Tartrat
3 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$
5 g KJ
in 1 000 ml 0,2 N NaOH gelöst.

Bestimmungsansatz:
0,1 ml Rohextrakt
0,75 ml H_2O bidest.
0,15 ml 3 M Trichloressigsäure

Das gefällte Protein wurde wie bereits beschrieben abzentrifugiert und dann in 0,5 ml 4 N KOH aufgenommen. Nachdem das Protein vollständig gelöst war, wurden 4,5 ml H_2O bidest. und 5 ml Biuretreagenz hinzugefügt und 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Unmittelbar darauf wurde in einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 bei 546 nm in 2 cm Küvetten die Extinktion gegen einen Leerwert gemessen. Der Proteingehalt errechnete sich durch Multiplikation der Extinktionswerte $OD_{2\ cm}^{546\ nm}$ mit dem Faktor 18,1, der aus einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin ermittelt worden war.

Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (1942)

Mit einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 wurde die Extinktion gereinigter Proteinlösungen bei 260 und 280 nm gegen einen Nullwert gemessen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe dieser Meßwerte aus einer Tabelle ermittelt (Nomograph von E. Adams Calif. Corp. for Biochemical Research, California).

6. Konzentrieren von Proteinlösungen

Sämtliche Konzentrierungsschritte wurden in Ultrafiltrationszellen und mit Membranen der Firma Amicon (Oosterhout (N.B.), Holland) durchgeführt.

Ultrafiltrationsgeräte: UF Zelle 12 (bis 10 ml);
UF Zelle 52 (bis 65 ml);
UF Zelle 202 (bis 200 ml)

Für größere Volumina (bis 600 ml) wurde das Hochleistungs-UF System TCF 10 eingesetzt. Das Ende der Filtration wurde mit dem Endpunkt-Überwachungsgerät EC 20 kontrolliert.

Ultrafiltrationsmembranen: Die Auswahl der richtigen Ultrafiltrationsmembranen hing ab vom Ziel der Konzentrierung und der Art des Puffers, mit dem gearbeitet wurde. Es wurden vorwiegend Membranen der PM- und XM-Serien eingesetzt mit definierten Durchlaßgrenzen von 10 000 - 300 000 Dalton.

Die Filtrationen wurden mit Stickstoffdruck bei 4° C unter Beachtung des vom Membrantyp abhängigen optimalen Drucks durchgeführt.

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Spezifische Aktivitäten wurden im Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Proteinmenge ermittelt und in Einheiten (E) pro mg Protein angegeben. 1 E ist als der Umsatz von 1 µMol Substrat pro Minute definiert.

7.1. Photometrische Messungen

Die Messungen wurden mit den Zeiss-Photometern PM 4 und PL 4 durchgeführt und über einen TE-Wandler der gleichen Firma von einem Kompensationsschreiber (Servogor, RE 511, Firma Metrawatt AG) aufgezeichnet. Die Küvettenschlitten wurden auf 30° C temperiert; die Standard-Tests in 1 oder 3 ml Küvetten bei 1 cm Schichtdicke durchgeführt.

I. Citrat-Lyase; 366 nm (MOELLERING und GRUBER, 1966)

0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7,6	2,85 ml
$ZnCl_2$ (4 mg/ml)	0,05 ml
NADH (10 mg/ml)	0,05 ml
0,1 M Citrat, Na-Salz	0,02 ml
LDH (2 mg/ml)	0,01 ml
MDH (2 mg/ml)	0,01 ml
Enzymlösung	0,01 ml
	3,0 ml

II. Citrat-Lyase; 366 nm (modifiziert für das Enzym aus Rps. gelatinosa)

1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4-Puffer, pH 7,2	0,3 ml
0,1 M $MgCl_2$	0,09 ml
0,015 M $NADH_2$	0,06 ml
MDH	0,01 ml
0,1 M Tri-Na-Citrat	0,06 ml
Protein	0,005 - 0,05 ml
H_2O bidest.	2,45 - 2,50 ml
	3,0 ml

III. Citrat-Lyase; 280 nm (TATE et al., 1965)

0,1 M TEA-HCl-Puffer, pH 7,4	2,4 ml
0,03 M $MgCl_2$	0,2 ml
0,15 M Tri-Na-Citrat	0,2 ml
Enzym	0,2 ml
	3,0 ml

Citratbestimmung; 366 nm (DAGLEY, 1970)

0,1 M TEA-HCl-Puffer, pH 7,6	2,40 ml
0,03 M $ZnCl_2$	0,05 ml
0,015 M $NADH_2$	0,05 ml
MDH (1 mg/ml)	0,01 ml
Citrat-Lyase (in 0,01 M TEA-HCl-Puffer, pH 7,6 + 0,04 mg $ZnCl_2$/ml und 60 mg $(NH_4)_2SO_4$/ml) 3 mg/0,3 ml	0,01 ml
Probe	0,1 - 0,5 ml
H_2O bidest.	0 - 0,38 ml
	3,0 ml

Glutamat-DH; 366 nm (BERGMEYER, 1970)

0,070 M TEA-HCl-Puffer, pH 8,0	0,89 ml
0,015 M $NADH_2$	0,02 ml
2 M Ammoniumacetat-Lsg.	0,05 ml
0,233 M α-KGS	0,03 ml
Enzymlösung	0,01 ml
	1,0 ml

Urease; 366 nm

0,050 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0	2,3 ml
0,015 M $NADH_2$	0,06 ml
0,25 M α-KGS	0,01 ml
0,3 M Harnstoff	0,10 ml
Glutamat-DH (20 mg/ml)	0,10 ml
Urease (50 E/mg)	0,05 ml
H_2O	0,38 ml
	3,0 ml

Katalase; 240 nm

Wasserstoffperoxid (30 %ig)	0,16 ml
+ 0,050 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0	ad 100 ml
Von diesem Gemisch	2,9 - 2,99 ml
Katalase	0,01 - 0,1 ml
	3,0 ml

Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase; 366 nm (Boehringer Information)

0,05 M TEA-HCl/NaOH-Puffer, pH 7,6	2,78 ml
0,015 M $NADH_2$	0,05 ml
0,05 M Fructose-1,6-Diphosphat	0,05 ml
GDH/TIM (2 mg/ml)	0,02 ml
Enzymlösung	0,10 ml
	3,0 ml

8. Bestimmung von Radioaktivität

Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Flüssigkeits-Szintillations Spektrometer (Tri-Carb, Mod. 3375, Firma Packard, Frankfurt/M.) durchgeführt. Es wurde die Aktivität von ^{14}C-Verbindungen in einem fertig

gemischten Szintillationscocktail (Insta-Gel, Firma Packard) bestimmt. Dabei konnte der Anteil der wäßrigen Phase im Gegensatz zur Szintillations-Lösung nach BRAY (1960) bis 50 % des Gelvolumens betragen. Wäßrige Proben mit hohem Feststoffanteil (z. B. Polyacrylamid) wurden vor der Auszählung mit einem Lösungsvermittler (Soluene 350, Firma Packard) nach BOHRER (1971) inkubiert.

Szintillationslösung nach BRAY (1960)

Naphthalin	60 g
2,5 PPO	4 g
1,4 POPOP	0,4 g
CH_3OH	100 ml
Dioxan	850 ml

Äthylenglycol wurde weggelassen.

9. Anreicherung

Für die Anreicherung der Citrat-Lyase erwies es sich als günstig, von frisch geernteten Zellen auszugehen. Durchschnittlich 250 g auf Citrat gewachsene Zellen von Rhodopseudomonas gelatinosa, in 75 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen, ergaben 850 ml Rohextrakt. Daraus wurde das Enzym gemäß nachstehend beschriebenem Verfahren als Enzym-SH angereichert. Es wurde darauf geachtet, daß die Temperatur der Proteinlösung 4° C nicht überschritt.

9.1. Abtrennung von Chromatophoren und Membranfragmenten

Vor einer säulenchromatographischen Trennung mußten diese hochmolekularen Strukturen entfernt werden, da sie die Durchflußrate erheblich herabsetzten. Als geeignetste Methode erwies sich hierfür eine hochtourige Zentrifugation (Omikron, Firma Christ) über 4 Stunden bei 100 000 x g.

Das Sediment wurde in beschriebenem Puffer aufgenommen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieses Pellet war nahezu Citrat-Lyase-frei.

9.2. Abtrennung niedermolekularer Zellkomponenten durch Ultrafiltration

Die Überstände beider Zentrifugationen (etwa 800 ml) wurden vereinigt und portionsweise in eine Ultrafiltrationszelle mit einem Fassungsvermögen von 650 ml (TCF-10, Firma Amicon) gegeben. Durch Verwendung einer Membran mit definierter Ausschlußgrenze bei einem Molekulargewicht von 300 000 (XM-300, Firma Amicon) konnten Moleküle mit einem kleineren Molekulargewicht abgetrennt werden. Um eine vollständige Reinigung zu erlangen, wurde vor der Konzentrierung eine Diafiltration durchgeführt, d. h. Filtration bei konstantem Volumen bis das Ultrafiltrat mindestens das zweifache des Ausgangsvolumens betrug. Daran schloß sich eine Konzentrierung auf ein Volumen von 250 ml an.

9.3. Fällung mit Protaminsulfat

Nucleinsäuren wurden in der Kälte durch tropfenweises Zusetzen einer 2 %igen Protaminsulfatlösung (0,1 ml/ml) zum Extrakt ausgefällt. Um eine gleichmäßige Verteilung des Protaminsulfats zu erzielen, wurde während und für 30 Minuten nach dem Zutropfen magnetisch gerührt. Der Niederschlag, bestehend aus Nucleinsäuren und mitgerissenem Protein, wurde 40 Minuten bei 20 000 x g abzentrifugiert (Zeta 20, Firma Christ).

9.4. Säulenchromatographie

DEAE-Zellulose-Chromatographie

Der Überstand der Protaminsulfatfällung wurde in einer Diaflo-Kammer auf 200 ml konzentriert und auf eine Chromatographiesäule (5,0 x 60 cm;

K 50/60, Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben, die mit äquilibrierter DEAE-Zellulose (DE 52, Firma Whatman, Balston Ltd.) 45 cm hoch gefüllt worden war. Die Säule wurde so lange mit 75 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ nachgewaschen, bis das Eluat nahezu proteinfrei war (Durchflußphotometer, Uvicord II, LKB, Bromma, Schweden). Dann wurde mit 400 ml 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ + 50 mM KCl eluiert (Durchflußrate: 15 Fraktionen/Std.). Die Fraktionen (V = 6 ml) mit deutlicher Citrat-Lyase-Aktivität wurden vereinigt und in einer Diaflo-Kammer konzentriert (Membran XM 300, 0,3 atü).

Sepharose-6B-Chromatographie

Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine Chromatographiesäule (K 26/70; Füllhöhe mit Sepharose 6 B 60 cm) aufgetragen, die mit einer zweiten (K 25/100; Füllhöhe 90 cm) gekoppelt war. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde nur die letzte Säule verwendet. Die Gelfiltration wurde mit 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt (Durchflußrate: 9 ml/Std.; Franktionsvolumen 1,5 ml). Nur Fraktionen mit hoher Citrat-Lyase-Aktivität wurden vereinigt und eventuell konzentriert; als Maß für den Proteingehalt der Fraktionen diente die Absorption bei 280 nm.

Zusätzliche Reinigungsschritte

Gelfiltration an Sephadex G-200, Sepharose 6 B oder Sepharose 4 B

Die Citrat-Lyase war nach den vorstehend beschriebenen Anreicherungsgängen noch nicht vollständig von Fremdprotein befreit. Deshalb war eine weitere Säulenchromatographie erforderlich; diese wurde in einem Chromatographierohr K 15/90, Füllhöhe 80 cm, durchgeführt. Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml wurden genommen; die Durchflußrate war 9 ml/Std. Mit Sepharose 6 B und 4 B ließ sich ein von Fremdprotein freies Citrat-Lyase-Präparat gewinnen.

10. Reaktivierung der Citrat-Lyase zum Enzym SH

Nach Beendigung der Anreicherung war das Enzym, wenn keine SH-Reagenzien zugesetzt worden waren, nur noch zu etwa 20 % katalytisch aktiv. Da das Enzymmolekül aber völlig intakt war, kam als Erklärung für den Verlust an Aktivität nur eine Oxidation katalytisch wichtiger SH-Gruppen in Frage. Ein bei -18° C mit 3 mM DTT oder DTE aufbewahrtes Enzympräparat zeigte nach zwei Monaten ebenfalls einen Verlust an Aktivität bis zu 60 %. Sowohl frisches Enzym als auch aufbewahrtes ließen sich durch 15 - 20 minütige Inkubation bei 30° C mit 3 mM DTT oder DTE zu 95 % wieder in die reduzierte Form überführen.

10.1. Überführung des SH-Enzyms in das Acetyl-S-Enzym (BUCKEL et al., 1971)

Bevor die Aktivität bestimmt werden konnte, mußte das SH-Enzym acetyliert werden. Hierzu wurde neben Essigsäureanhydrid auch Acetylimidazol als Acetylierungsmittel verwendet. Für Routinebestimmungen genügte es, 1 Minute bei 30° C im Testansatz vor Zugabe des Substrats mit 1,75 mM Acetanhydrid zu aktivieren. Die Konzentration an Acetanhydrid war ausreichend für einen Proteingehalt von 5 - 100 µg Enzymprotein im Ansatz. Wenn für vergleichende Messungen definierte Ausgangsaktivitäten erforderlich waren, wurde ein Aliquot Enzymlösung (1 mg Prot./ml) bei 4° C mit 3,5 mM Acetanhydrid bzw. 50 mM Acetylimidazol acetyliert. Das aktivierte Enzym verlor über einen Zeitraum von 8 Stunden bei 4° C nicht an Aktivität.

10.2. Aufbewahrung des angereicherten Enzyms

Zur Aufbewahrung des Enzyms wurden drei verschiedene Bedingungen geprüft, jeweils in verschlossenen Glasröhrchen.

a) In Portionen zu 0,5 und 1 ml bei -18° C

b) Unter Zusatz von 50 % Glyzerin bei -18° C

c) Mit 0,02 % Natrium-azid bei + 4° C

Als effektivste erwies sich Bedingung a).

11. Elektrophorese

11.1. Analytische Disk-Elektrophorese

Die Analyse von Proteinproben auf ihren Gehalt an Fremdprotein erfolgte routinemäßig in Polyacrylamid-Gelen; gelegentlich wurde diesen zur Verringerung der Porenweite 0,5 % Agarose zugesetzt. Die Gele wurden in Glasröhrchen von 14 cm Länge und 6 mm Innendurchmesser erstellt. Dabei wurden für das großporige Obergel (Sammelgel) 0,3 ml und für das feinporige Untergel (Trenngel) 2,5 ml evakuierte Gellösung verwendet. Die Lösungen wurden sofort nach dem Einfüllen mit 0,2 ml H_2O bidest. überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation durch eindiffundierenden Luftsauerstoff zu verhindern. Die Polymerisation des Obergels wurde mittels einer UV-Lampe (DUL-90, Firma WTW, Weilheim i. OB) gesteuert. Bei Verwendung von Polyacrylamid/Agarose Mischgelen wurde das Obergel weggelassen. Die Elektrophoresen wurden in den WTW-Trennkammern EA 100 und DEA 90 (Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim i. OB) mit einem Fassungsvermögen von 6 bzw. 16 Röhrchen durchgeführt. Die bei der elektrophoretischen Trennung auftretende Joulsche Wärme wurde mittels Wasserkühlung der Kammern abgeführt; eine Pufferumwälzung zwischen Kathoden- und Anodenraum besorgte eine Schlauchpumpe Typ 100 der Firma Heidolph, Kelkheim. Über das Stromkonstantgerät GT 90 (Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim i. OB) wurden die Kammern mit stabilisiertem Strom versorgt.

11.2. Gelsysteme zur analytischen Disk-Elektrophorese

Um optimale Trennbedingungen zu ermitteln und möglichen Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu entgehen, wurden Enzymproben in vier verschiedenen Systemen analysiert. Dabei wurden sowohl Trenn-pH-Wert als auch Gelkonzentration variiert. Die Systeme A - C entstammen der Bedienungsanleitung zum Elektrophoresegerät DEA 90 der Firma WTW; System Nr. C wurde nach Angaben von PEACOCK und DINGMAN (1968) modifiziert und in dieser Form als System D bezeichnet. Die Angaben zum pH-Wert betreffen den pH des Gelpuffers; die %-Angaben beziehen sich auf Gewicht/Volumen.

A. Mittelporgel (7,5 %, pH 8,9)

Die unter a, b, c, ... aufgeführten Substanzen wurden in 100 ml H_2O bidest. gelöst.

a) 1 N HCl	48,0 ml	b) Acrylamid	30,0 g
Tris	36,6 g	Bis	0,8 g
TEMED	0,23 ml	c) Ammoniumpersulfat	0,14 g
d) 1 M H_3PO_4	25,6 ml	e) Acrylamid	10,0 g
Tris	5,7 g	Bis	2,5 g
f) Riboflavin	4,0 mg	g) Saccharose	40,0 g

Unteres Gel:	1 Teil a)	Oberes Gel:	1 Teil d)
	2 Teile b)		2 Teile e)
	1 Teil H_2O		1 Teil f)
	4 Teile c)		4 Teile g)

Elektroden-Pufferlösung:

Tris	6,0 g	
Glycin	28,8 g	pH 8,3
H_2O	ad 1 l	

B. Großporgel (3,75 %, pH 8,9)

a) Acrylamid	15,0 g	d) 1 M H_3PO_4	25,6 ml
Bis	0,4 g	Tris	5,7 g
b) 1 N HCl	48,0 ml	e) Acrylamid	10,0 g
Tris	36,6 g	Bis	2,5 g
TEMED	0,23 ml	f) Riboflavin	4,0 mg
c) Riboflavin	4,0 mg	g) Saccharose	40,0 g

Unteres Gel:	2 Teile a)	Oberes Gel:	1 Teil d)
	1 Teil b)		2 Teile e)
	1 Teil c)		1 Teil f)
	4 Teile H_2O		4 Teile g)

Elektrodenpufferlösung wie System Nr. A.

C. Mittelporgel (7,5 %, pH 7,5)

a) 1 N HCl	48,0 ml	d) 1 M H_3PO_4	39,0 ml
Tris	6,85 g	Tris	4,95 g
TEMED	0,46 ml	TEMED	0,46 ml
b) Acrylamid	30,0 g	e) Acrylamid	10,0 g
Bis	0,8 g	Bis	2,5 g
c) Ammoniumpersulfat	0,14 g	f) Riboflavin	4,0 mg
		g) Saccharose	40,0 g

Unteres Gel:	1 Teil a)	Oberes Gel:	1 Teil d)
	2 Teile b)		2 Teile e)
	1 Teil H_2O		1 Teil f)
	4 Teile c)		4 Teile g)

Elektrodenpufferlösung:

Diäthylbarbitursäure	5,52 g	
Tris	1,0 g	pH 7,0
H_2O	ad 1 l	

D. Großporgel (3,0 %, pH 7,5 + 0,5 % Agarose)

a) 1 N HCl	48,0 ml	c) Ammoniumpersulfat	0,14 g
Tris	6,85 g	d) Agarose	4,0 g
TEMED	0,46 ml		
b) Acrylamid	12,0 g		
Bis	0,8 g		

Unteres Gel: 1 Teil a)
2 Teile b)
4 Teile c)
1 Teil d)

Elektrodenpufferlösung:

Siehe C. oder wie bei den einzelnen Experimenten angegeben.

Anmerkung: Die Agarose-Lösung wurde vor der Zugabe kurz aufgekocht und bei 50° C aufbewahrt. Nach Temperaturangleich der übrigen Komponenten des Trenngels auf diesen Wert wurden die Lösungen entlüftet, vereinigt und danach wie üblich weiterbehandelt.

E. Großporgel (5 %, pH 7,1, modifiziert nach BENDER, 1972)

a) Untergel oder Trenngel

5,0 g Acrylamid, 0,12 g Bis und 3,75 mg $K_3Fe(CN)_6$ wurden in 50 ml 0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4-Puffer, pH 7,1 unter leichtem Schütteln gelöst. Nach Zugabe von 0,06 ml TEMED und 0,7 g Ammoniumpersulfat,

wurde mit H_2O bidest. auf 100 ml aufgefüllt und evakuiert. 2,5 ml dieser Lösung wurden in Elektrophoreseröhrchen gefüllt und polymerisiert.

b) Ober- oder Sammelgel

4,0 g Acrylamid, 0,1 g Bis und 3,25 mg $K_3Fe(CN)_6$ wurden in 50 ml des obigen Phosphatpuffers gelöst. 0,06 ml TEMED und 0,7 g Ammoniumpersulfat wurden hinzugefügt und mit H_2O bidest. auf 100 ml aufgefüllt. Nach Entlüftung im Vakuum wurde mit 0,5 ml dieser Lösung pro Röhrchen das bereits polymerisierte Untergel überschichtet.

Elektrodenpufferlösung:

50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,1

11.3. Durchführung und Auswertung der analytischen Disk-Elektrophorese

Proteinlösungen wurden mit gemahlener Saccharose zu 10 %iger Endkonzentration beschwert; als Markierungsfarbstoff wurden einige Kristalle Bromphenolblau hinzugesetzt. Die Glasröhrchen mit den Gelen wurden in die Trennkammer eingesetzt und dann 10 - 200 µg Protein aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 2 mA/Röhrchen gestartet bis die Farbbande das Trenngel erreicht hatte; dann wurde auf 3 mA/Röhrchen erhöht. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder zerstückelt (Gelschneider, Firma Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) oder in folgender Färbelösung für eine Stunde inkubiert (nach KOENIG et al., 1970):

10 ml 1 %iger Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) in
400 ml einer Mischung von 60 g TCA in
800 ml H_2O
200 ml Methanol und
70 ml Eisessig.

Entfärbt wurde für 12 Stunden in einer Mischung von:

120 ml Methanol
20 ml Eisessig
280 ml H_2O

Die Gele wurden densitometrisch mit einem Flying Spot Densitometer (Firma Vitatron, Holland) ausgewertet und anschließend in der Entfärbelösung aufbewahrt.

11.4. Vertikale Plattenelektrophorese

Diese Methode bietet den Vorteil der Vergleichbarkeit vieler Proben im gleichen Lauf und im gleichen Gel. Die Elektrophorese wurde in der von STEGEMANN (1972) entwickelten Apparatur durchgeführt. Es wurden 4 mm starke Gele gegossen, die eine Auftragmenge von 5 - 100 µl Proteinlösung pro Geltasche gestatteten; insgesamt standen pro Platte 8 Taschen zur Verfügung. Die Polyacrylamidgele hatten folgende Zusammensetzung: 7,5 - 3,0 g Acrylamid (aus Chloroform umkristallisiert) und 375 - 150 mg Bis in 150 ml des jeweiligen Elektrodenpuffers (Tris/Borat, 0,125 M, pH 8,9; Diäthylbarbitursäure/Tris, 0,1 M, pH 7,2; Imidazol/DL-Asparaginsäure, 0,05 M, pH 7,3; K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0,1 M, pH 7,1). Diese Monomerenlösung wurde filtriert und anschließend mit 50 mg Na-sulfit, 0,1 ml TEMED und 2,8 ml 2 %iger Ammoniumpersulfatlösung versetzt. Anschließend wurde für etwa 2 Minuten in einer Saugflasche entgast; sofort darauf mußte das Gel luftblasenfrei in die Kammer gefüllt und der Taschenformer eingesetzt werden. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Taschenformer vorsichtig entfernt und die Kammer aufrecht in eine Schale mit Puffer (Anodenraum) gestellt. Der Kathodenraum wurde ebenfalls bis zur Höhe des Überlaufstutzens mit dem gleichen Puffer gefüllt. Die Pufferzirkulation zwischen diesen beiden Räumen besorgte eine Schlauchpumpe. Nachdem die mit Saccharose oder Ficoll (10 - max. 50 %) beschwerten Proben (5 - 100 µl)

in die Taschen eingefüllt waren, konnte die Elektrophorese gestartet werden. Die Elektrophorese wurde mit 15 mA und 130 - 150 Volt durchgeführt, so lange bis die Bande des Indikatorfarbstoffes (bis 200 Volt Bromphenolblau; für höhere Spannungen Amidoschwarz) das Ende der Platte erreicht hatte. Dies war nach 5 bis 6 Stunden der Fall. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelplatte vorsichtig aus der Trennkammer herausgenommen und für 1 Stunde pro mm Gelstärke in der bereits beschriebenen Färbelösung angefärbt. Bei präparativen Arbeiten wurde nur ein Streifen der Platte gefärbt, der übrige Teil zur Elution des Proteins eingesetzt. Die Auswaschung des überschüssigen Farbstoffes erfolgte in einer Mischung von Methanol, H_2O, Eisessig (6 : 14 : 1) auf einer Laborwippe (Firma Müller, Hann. Münden). Nach genügender Entfärbung wurden die Platten ausgewertet (Photographie, Densitometer) und danach mit 7 % Essigsäure in Plastikbeuteln eingeschweißt.

11.5. SDS-Elektrophorese (modifiziert nach WEBER und OSBORN, 1969)

Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde ausschließlich nach dem zuvor beschriebenen Plattenverfahren durchgeführt.

Elektrophorese- und Gelpuffer:

A: 179,1 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O zu 1 000 ml H_2O bidest.
B: 69,0 g NaH_2PO_4 x H_2O zu 1 000 ml H_2O bidest.

Zum Gebrauch wurden 34,8 ml A und 15,2 ml B auf 1 000 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt, das ergab 0,025 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,1. Hierin wurden 1 g SDS gelöst zu 0,1 %iger Endkonzentration.

Zusammensetzung des Gels:

7,5	g	Acrylamid
0,2	g	Bis
50	mg	Na-Sulfit
0,1	ml	TEMED
2,8	ml	2 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung

in 150 ml dodecylsulfathaltigem Na-Phosphat-Puffer, pH 7,1.

11.6. Vorbereitung der Enzymproben und Referenzenzyme

Da die Citrat-Lyase nach der Anreicherung in gelöster Form in Kaliumphosphat-Puffer vorlag, mußte sie zunächst auf den Elektrophoresepuffer (0,025 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,1) umäquilibriert werden. Die Referenzenzyme wurden als Lyophilisat von der Firma Boehringer Mannheim bezogen und ebenfalls im Elektrophoresepuffer aufgenommen (1 mg/ml). Für die Citrat-Lyase wurden zur Überprüfung einer reproduzierbaren Spaltung des Enzyms die Präinkubationsbedingungen wie folgt variiert:

a) Proteinproben in 25 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,1 wurden mit 1 % SDS und 1 % 2-Mercaptoäthanol 2 Minuten bei 100° C inkubiert, auf Zimmertemperatur abgekühlt und gegen Puffer + 0,1 % SDS und 2-Mercaptoäthanol ungefähr 6 Stunden dialysiert.

Bei der Beschreibung der folgenden Methoden wurde nur beschrieben, wodurch sie sich von a) unterscheiden.

b) Proteinproben wurden mit 1 % SDS und 1 % 2-Mercaptoäthanol plus - minus Zusatz von 8 M entionisiertem Harnstoff, 10 Minuten auf 60° C erhitzt und über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert.

c) Proteinproben wurden mit 1 % SDS und 1 % 2-Mercaptoäthanol bzw. 2 mM DTE, plus - minus 8 M Harnstoff, 12 Stunden bei Zimmertemperatur

inkubiert.

d) Proteinproben wurden mit 8 M Harnstoff und 2 mM DTE 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

e) Proteinproben wurden mit 1 % SDS und 50 mM Jodacetamid 3 Stunden bei 37° C inkubiert.

f) Perameisensäureoxidation

0,5 - 2,0 mg Protein wurden in einer Mischung von 1 Teil 30 % H_2O_2 und 9 Teilen 88 % Ameisensäure gelöst und 1 Stunde bei 0° C inkubiert. Dann wurde mit H_2O bidest. 1 : 10 verdünnt, bei -18° C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Dieses Pulver wurde in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0 + 1 % SDS aufgenommen und über drei Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde gegen 0,01 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 (+ 0,1 % SDS + 1 mM DTE) dialysiert.

Von diesen vorbehandelten Proteinlösungen wurden für die Elektrophoreseläufe zur Bestimmung von Zahl und Größe der Polypeptidketten 5 - 80 µl pro Geltasche eingesetzt, nachdem sie vor dem Auftragen mit Saccharose beschwert und mit Bromphenolblau als Indikatorfarbstoff versetzt worden waren. Die Elektrophorese wurde 5 bis 5,5 Stunden bei 80 mA und 130 Volt durchgeführt. Färbung, Auswertung und Aufbewahrung der Platten wie bereits angegeben. Als Ergänzung des üblichen Anfärbeverfahrens wurde das von GRIFFITH (1972) beschriebene "prestaining" Verfahren zur Anfärbung von Untereinheiten bereits während der Elektrophorese herangezogen (Inkubation der Proteinprobe bei 70° C und pH 9,2 mit Remazol Brilliant Blue (Serva/Heidelberg) für 10 Minuten).

12. Zentrifugation

12.1. Analytische Ultrazentrifugation

Experimente zur Bestimmung des Molekulargewichtes des Gesamtmoleküls und der Untereinheiten, sowie der dazugehörigen Svedberg-Konstanten wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman-Spinco, Modell E) durchgeführt. Dazu wurden Doppelsektor-Zellen mit Saphirfenstern und 12 mm Lichtweg verwendet; die Dokumentation von Sedimentations-Gleichgewichtsmessungen erfolgte mittels eines photoelektrischen Scanners (280 nm).

Die Bedingungen, unter denen Sedimentationsexperimente durchgeführt wurden, waren wie folgt:

a) Molekulargewicht des Gesamtenzyms:
4 800 Upm. und 5° C für verschiedene Proteinkonzentrationen.

b) Molekulargewicht der Untereinheiten:
15 000 Upm. bei 20° C; für verschiedene Proteinkonzentrationen in 2 - 8 M Harnstoff für 3 Stunden.

c) Ermittlung der Svedberg-Konstanten $S_{c\ app.}$
36 000 Upm. bei 5° C.

Die Messungen wurden in 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ durchgeführt.

12.2. Dichtegradienten-Zentrifugation

Das Sedimentationsverhalten in einem linearen Dichtegradienten wurde in Anlehnung an die von MARTIN und AMES (1961) beschriebene Methode mit einer Beckman-Spinco-Ultrazentrifuge (Modell L2 - 65 B; Rotor SW 40

bei 40 000 Upm für 12 Stunden, 5° C) ermittelt. Es wurden Cellulose-Nitrat-Röhrchen (1,4 cm Ø; 9,5 cm Länge) mit je 13,8 ml folgender Lösungen vorsichtig gefüllt:

a) 5 - 20 % Sucrose w/w in 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2
b) 5 - 20 % Ficoll w/w in 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$
c) 5 - 10 % Ficoll w/w in 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2
d) 2 - 5 % Ficoll w/w in 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2

Auf den Gradienten wurden 0,5 ml Citrat-Lyase-Lösung (0,5 mg Protein) mit je 0,5 mg der Referenzproteine Cytochrom c, Katalase und Urease vorsichtig aufgegeben. Zur Auswertung wurde das Röhrchen von unten mit einer Hohlnadel angestochen und Fraktionen von je 5 Tropfen (≙ 0,21 ml) gewonnen; hiermit wurde auf Enzymaktivität getestet bzw. die Absorption gemessen.

13. Elektronenmikroskopie

Citrat-Lyase aus Rps. gelatinosa und S. diacetilactis in 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 wurde mit H_2O bidest. auf Proteinkonzentrationen von 50 - 100 µg pro ml verdünnt. Die Enzyme wurden in Anlehnung an die von VALENTINE et al. (1968) für Glutamin-Synthetase aus E. coli beschriebene Methode im Negativkontrastierungs-Verfahren abgebildet. Das von VALENTINE beschriebene Verfahren wurde dabei folgendermaßen variiert:

a) Mit wenigen Ausnahmen wurde das Enzym nicht fixiert (0,5 % Glutaraldehyd).

b) Als Negativ-Kontrastierungsmittel wurde Uranylacetat (4 %ig, pH 5 in H_2O) verwandt.

c) In einigen Kontrastierungsversuchen wurde der auf der Negativ-Kontrastierungs-Lösung schwimmende Kohlefilm nicht von oben mit einem un-

beschichteten Kupfernetzchen aufgetupft, sondern von unten (d. h. aus dem Uranylacetat heraus nach oben) mit einem kohlebeschichteten Kupfernetzchen herausgehoben. Das hatte zur Folge, daß nun die Enzymmoleküle zusammen mit der Negativ-Kontrastierungs-Lösung zwischen zwei Kohleschichten eingeschlossen waren. Das überflüssige Kontrastierungsmittel wurde anschließend mit Filterpapier abgesaugt.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskope EM 9 S-2 der Firma Zeiss, Oberkochen und EM 301 der Firma Philips, Eindhoven angefertigt.

14. Säulenchromatographie

14.1. Bestimmung des Molekulargewichtes mit Sepharose 6 B

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration wurde von ANDREWS (1964) beschrieben. Für die Chromatographie wurden zwei Säulen (Pharmacia K 25/90 + K 26/70) miteinander verbunden und mit Sepharose 6 B zu einer Höhe von 80 bzw. 65 cm gefüllt; das Gel war gegen 0,1 M KPO_4-Puffer, pH 7,2 + 3 mM $MgCl_2$ äquilibriert worden. Auf das Säulenbett wurde Puffer aufgetragen und mit 4 ml Proteinlösung unterschichtet, die 10 mg Citrat-Lyase, 5 mg Ferritin, 5 mg Urease, 5 mg Glutamat-DH, 5 mg Katalase, 5 mg Aldolase und 6 mg Cytochrom c (Boehringer Combithek Größe I) enthielt. Durch hydrostatische Druckregulierung (Mariottsche Flasche) wurden ein konstantes Fraktionsvolumen (1,48 - 1,51 ml) und eine Durchflußrate von 10 ml/Stunde aufrechterhalten. Die Aktivität der Referenzenzyme und der Citrat-Lyase wurde wie beschrieben bestimmt; Ferritin und Cytochrom c wurden auf Grund ihrer Absorption bei 400 bzw. 415 nm in den Fraktionen lokalisiert. Die Fraktion mit max. Aktivität wurde für die Berechnung des Elutionsvolumens verwendet.

14.2. Gelfiltration in denaturierenden Lösungen

Chromatographierohre (1,5 x 100 cm) wurden zu einer Höhe von 85 cm mit äquilibrierten Gelen gefüllt.

a) Sepharose 4 B äquilibriert gegen 0,1 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7,2 + 1,2 mM SDS + 1 mM DTE.

b) Bio-Gel A-5 M (Bio-Rad Laboratories, München) äquilibriert gegen 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7,4 + 8 M Harnstoff + 1 mM DTE.

c) Bio-Gel A-1,5 M (Bio-Rad Laboratories, München) äquilibriert gegen 6 M Guanidin HCl + 1 mM DTE.

Denaturierte CL und die Referenzproteine (Ferritin, Cytochrom c) wurden nach Präinkubation (s. Legenden) zusammen mit den angegebenen weiteren Zusätzen auf das Gelbett aufgetragen. Eluiert wurde mit den entsprechenden Äquilibrier-Lösungen. Mittels einer Mariottschen Flasche wurden eine niedrige Durchflußrate (5 ml/Std.) und ein konstantes Fraktionsvolumen (1,48 - 1,51 ml) aufrechterhalten. Eine Dansylierung der CL wurde nach der Methode von YOSHINO und TAKAGI (1963) durchgeführt. Fluoreszenzmessungen wurden in 0,5 ml Küvetten mit einem Fluoreszenz-Photometer (Firma Perkin-Elmer) bei einer Anregungsstrahlung von 350 nm Wellenlänge und einer Meßstrahlung von 520 nm Wellenlänge durchgeführt. Dextran-Blau wurde auf Grund seiner Absorption bei 630 nm gemessen; Ferritin und Cytochrom c bei 400 bzw. 415 nm. Die Fraktion mit maximaler Absorption wurde zur Berechnung des Elutionsvolumens verwendet.

15. Bestimmung von Pantothensäure

15.1. Hydrolyse von Citrat-Lyase und Coenzym A

Aus Enzymlösungen wurde die CL mit 3 M Trichloressigsäure ausgefällt. Das Präzipitat wurde in KOH (0,2 M; 1,0 M) gelöst, Coenzym A wurde gleich hierin aufgenommen und in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen hydrolysiert. Angaben über Zeit und Temperatur im Ergebnisteil (4.4.3.). Nach der Hydrolyse wurde der pH-Wert mit 5 M HCl auf 8,5 eingestellt und mit Tris-HCl, pH 8,5 (Endkonzentration 100 mM) gepuffert. Das hierbei entstandene Präzipitat wurde 20 Min. bei 4 000 Upm abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit wenig H_2O gewaschen. Dieses Waschwasser wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt; 10 µg/ml alkalische Phosphatase zugesetzt und 24 Std. bei 37° C inkubiert. Bei längerer Inkubation (72 Std.) wurde mit einem Tropfen Toluol überschichtet. Nach Abstoppen der Phosphatase-Reaktion (3 Min. - 100° C) wurden aliquote Teile der Hydrolysate in die Wachstumsbestimmungen eingesetzt.

15.2. Durchführung der Wachstumsbestimmung

Das Wachstum von L. pantarum (DSM 20205) wurde in pantothenatfreiem "Pantothenat-Assay-Medium", AOAC, der Firma Difco, Detroit, unter Zusatz definierter Pantothenatmengen verfolgt. Stichkulturen wurden wöchentlich neu in "Lactobacilli Agar" angelegt. Das Impfmaterial für den Test wurde in "Lactobacilli-Broth" angezogen. Nach 16 Std. wurden diese Kulturen abzentrifugiert, einmal mit pantothenatfreiem Medium gewaschen und dann in 10 ml dieses Mediums aufgenommen. Eichkurve (5,0 - 25,0 ng Pantothenat) und Bestimmungsansätze wurden mit einem Tropfen dieser Bakteriensuspension beimpft. Ansetzen der Eichkurve siehe Difco Vorschrift (1971). Nach 14 Std. Wachstum bei 37° C wurden die Experimente durch Messung der Trübung bei 546 nm ausgewertet.

Chemikalien und Enzyme

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und J. T. Baker Deventer (Holland) verwendet. Die speziellen Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft: Sephadex G-10, -25, -100 und -200 sowie DEAE-Sephadex, Sepharose 6 B, - 4 B und Ficoll von der Firma Pharmacia (Uppsala); DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher DE 52 von Whatman, Balston Ltd., Great Britain. 1,5^{14}C-Citrat (20,2 mCi/mMol) von Radiochemical Centre, Amersham via Firma Buchler, Braunschweig. Acrylamid, Bis, TEMED, Ammoniumpersulfat, Amidoschwarz, Coomassie-Brilliant Blue R 250, Remazol Brilliant-Blue, Dansylchlorid, DTNB, Guanidin-hydrochlorid, Protaminsulfat und entionisierter Harnstoff von Firma Serva, Heidelberg. $NADH_2$, Coenzym A, N-Acetyl-cysteamin, Fructose-1,6-diphosphat, Lactat-DH (100 mg/10 ml), Malat-DH (5 mg/ml), Citrat-Lyase (15 mg), Glycerol-3-P-DH/Triosephosphat-Isomerase (1 mg/ml), Eichproteine von der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim. Urease (50 E/mg) und Glutamat-DH (45 E/mg) von Miles-Seravac, London. Bacto-Yeast-Extrakt, Bacto-Lactobacilli-Agar, Bacto-Lactobacilli-Broth und AOAC-Pantothenate-Assay-Medium von Firma Difco, Detroit (Michigan) via Otto Nordwald KG, Hamburg.

LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, L. FULLER, R. C.	1967	Photosynthesis in Rhodospirillum rubrum. III. Metabolic Control of Reductive Pentose Phosphate and Tricarboxylic Acid Cycle Enzymes. Plant. Physiol. 42, 497 - 502.
ANDREWS, P.	1962	Estimation of Molecular Weights of Proteins by Gel-Filtration. Nature 196, 36 - 39.
ANDREWS, P.	1964	Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J. 91, 222 - 233.
ANDREWS, P.	1965	The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595 - 606.
ATKINSON, D. E. WALTON, G. M.	1967	Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. J. Biol. Chem. 242, 3239 - 3241.
BATES, R. G. BOWER, V. E. MICHAELIS, L. SÖRENSEN, S. P. L.		In: Puffersubstanzen und Pufferlösungen. Informationsschrift der Firma Riedel de Haen, Seelze-Hannover, S. 15 - 16.
BEISENHERZ, G. BOLZE, H. J. BÜCHER, Th. CZOK, R. GARBADE, H. K. MEYER-AHRENDT, E. PFLEIDERER, E.	1953	Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8 b, 555 - 557.
BENDER, R.	1972	Anreicherung und Charakterisierung der D-Gluconat-Dehydratase von Clostridium pasteurianum. Dissertation Göttingen.

BETHUNE, J. L.
ULMER, D. D.
VALLEE, B. L.
1964
Physiochemical Studies of Acetylcarboxy peptidase. I. pH Dependence of Structural Integrity.
Biochemistry 3, 1764 - 1768.

BEUSCHER, N.
GOTTSCHALK, G.
1972
Lack of Citrate Lyase - the Key Enzyme of the Reductive Carboxylic Acid Cycle - in Chlorobium thiosulfatophilum and Rhodospirillum rubrum.
Z. Naturforsch. 27 b, 967 - 973.

BITENSKY, M. W.
YIELDING, K. L.
TOMKINS, G. M.
1965
Reciprocal Changes in Alanine and Glutamate-Dehydrogenase Activities after Exposure of Crystalline Bovine L-Glutamate-Dehydrogenase to Organic Mercury.
J. Biol. Chem. 240, 663 - 673.

BJERRUM, J.
SCHWARZENBACH, G.
SILLEN, L. G.
1958
Stability Constants, part 2, Table 44, London: The Chemical Society.

BLAIR, J. McD.
DATTA, S. P.
TATE, S. S.
1967
Reversible Inactivation of Citrate Lyase: Effect of Metal Ions and Adenine Nucleotides.
Eur. J. Biochem. 1, 26 - 28.

BOHRER, L.
LEON, S. H. A.
1971
Rapid Processing and Counting Technique for Radioactive Materials in Polyacrylamide Gels.
Anal. Biochem. 42, 54 - 58.

BOWEN, T. J.
MORTIMER, M. G.
1970
The States of Aggregation of Citrate Lyase.
Biochem. J. 117, 71 P.

BOWEN, T. J.
MORTIMER, M. G.
1971
Sub-Units of Citrate Oxaloacetate Lyase.
Eur. J. Biochem. 23, 262 - 266.

BOWEN, T. J.
ROGERS, L. J.
1965
Amino-Acid Composition and Partial Specific Volume of Citrate Oxaloacetate Lyase.
Nature 205, 1316 - 1317.

BRAY, G. A.	1960	A simple efficient liquid scintillator for counting aquaeous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem. 1, 279 - 285.
BRITTEN, R. J. ROBERTS, R. B.	1960	High-Resolution Density Gradient Sedimentation Analysis. Science 131, 32 - 33.
BUCKEL, W. BUSCHMEIER, V. EGGERER, H.	1971	Der Wirkungsmechanismus der Citrat-Lyase aus Klebsiella aerogenes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1195 - 1205.
CANN, J. R. GOAD, W. B.	1968	In: Advances in Enzymology (F. F. Nord, editor), Vol. 30, 139, Interscience New York.
CARNEGIE, P. R.	1965	A peptide-mapping technique for the estimation of molecular size. Nature 206, 1128 - 1130.
CHARM, St. E. MATTEO, Ch. C.	1971	Scale-Up of Protein Isolation. In: Methods in Enzymology, Vol. XXII (B. Jakoby, editor), 476 - 556.
CLELAND, W. W.	1964	Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. Biochemistry 3, 480 - 482.
COLMAN, R. F. FRIEDEN, C.	1966	On the Role of Amino Groups in the Structure and Function of Glutamate Dehydrogenase. II. Effect of Acetylation on Molecular Properties. J. Biol. Chem. 241, 3661 - 3670.
COTTAM, G. L. SRERE, P. A.	1969	The Sulfhydryl Groups of Citrate Cleavage Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 130, 304 - 311.
DAGLEY, S.	1954	Dissimilation of Citric Acid by Aerobacter aerogenes and Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 11, 218 - 227.
DAGLEY, S.	1969	In: Methods in Enzymology (J. M. Lowenstein, editor) Vol. XIII, 160,

DAVISON, P. F.	1968	Proteins in Denaturing Solvents: Gel Exclusion Studies. Science 161, 906 - 907.
DEFFNER, M. FRANKE, W.	1939	Der Abbau der Citronensäure durch Bakterien. Justus Liebigs Ann. Chem. 541, 85.
DETERMANN, H. MICHEL, W.	1966	The Correlation Between Molecular Weight and Elution Behavior in the Gel Chromatography of Proteins. J. Chromatogr. 25, 303 - 313.
DIMROTH, P. DITTMAR, W. WALTHER, G. EGGERER, H.	1973	The Acyl-Carrier Protein of Citrate Lyase. Eur. J. Biochem. 37, 305 - 315.
DIXON, M. WEBB, E. C.	1965	Enzymes. 2. Ausgabe, Verlag Longmans und Green, S. 69 und 325.
DE DUVE, C. BERTHET, J. BEAUFAY, H.	1959	In: Progress in biophysics and biophysical chemistry Vol. 9, Pergamon Press, New York 325.
ELLMAN, G. L.	1959	Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77.
EPSTEIN, C. J. SCHECHTER, A. N.	1968	Ann. N.Y. Acad Sci. 151, 85.
FAWCETT, J. C. MORRIS, C. J. O. R.	1966	Separation Science 1, 9.
FISH, W. W. MANN, K. G. TANFORD, Ch.	1969	The Estimation of Polypeptide Chain Molecular Weights by Gel Filtration in 6 M Guanidine Hydrochloride. J. Biol. Chem. 244, 4989 - 4994.
FISH, W. W. REYNOLDS, J. A. TANFORD, Ch.	1970	Gel Chromatography of Proteins in Denaturing Solvents. J. Biol. Chem. 245, 5166 - 5168.

FRANKLIN, T. J. SNOW, G. A.	1973	Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
FRIEDEN, C.	1959	Glutamic Dehydrogenase. I. The Effect of Coenzyme on the Sedimentation Velocity and Kinetic Behavior. J. Biol. Chem. 234, 809 - 814.
GALL, W. E. CUMMINGHAM, A. WAXDAL, M. J. KONIGSBERG, W. H. EDELMAN, G. M.	1968	The Covalent Structure of a Human γ-G-Immunoglobulin. IV. The Interchain Disulfide Bonds. Biochemistry 7, 1973 - 1982.
GEST, H. ORMEROD, J. G. ORMEROD, K. S.	1962	Photometabolism of Rhodospirillum rubrum: Light-dependent Dissimilation of Organic Compounds to Carbon Dioxide and Molecular Hydrogen by an Anaerobic Citric Acid Cycle. Arch. Biochem. Biophys. 97, 21 - 33.
GIFFHORN, F. BEUSCHER, N. GOTTSCHALK, G.	1972	Regulation of Citrate Lyase Activity in Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 467 - 472.
GILLESPIE, D. C. GUNSALUS, I. C.	1953	An adaptive citric acid desmolase in Streptococcus faecalis. Bacterial Proc. 80 P.
GRIFFITH, I. R.	1972	Immediate Visualization of Proteins in Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels by Prestaining with Remazol Dyes. Anal. Biochem. 46, 402 - 412.
GRUNBERG-MANAGO, M.	1953	In: Methods in Enzymology Vol. V (S. P. Collowick und N. O. Kaplan, eds.), 624.
GUNSALUS, I. C.	1954	Oxidative and Transfer Reactions of Lipoic Acid. Fed. Proc. 13, 715 - 722.

GUNSALUS, I. C. 1955 Extraction of Enzymes from Microorganisms. In: Methods in Enzymology Vol. I, 51 - 61.

GUYNN, R. W.
GELBERG, H. J.
VEECH, R. L. 1973 Equilibrium Constants of the Malate Dehydrogenase, Citrate Synthase, Citrate Lyase and Acetyl Coenzyme A Hydrolysis Reactions under Physiological Conditions. J. Biol. Chem. 248, 6957 - 6965.

HANES, C. S. 1932 Studies on Plant Amylases. I. The Effect of Starch Concentration Upon the Velocity of Hydrolysis by the Amylase of Germinated Barley. Biochem. J. 26, 1406 - 1421.

HARTING, J.
VELICK, S. F. 1954 Transfer reactions of acetyl phosphate catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 207, 867 - 878.

HARVEY, R. J.
COLLINS, E. B. 1963 The Citritase of Streptococcus diacetilactis. Substrate, Products and Equilibrium. J. Biol. Chem. 238, 2648 - 2653.

HEPPEL, L. A. 1969 The effect of osmotic shock on release of bacterial proteins and on active transport. J. Gen. Physiol. 54, Suppl. 95 - 113 S.

HIRS, C. H. W.
HALMANN, M.
KYCIA, J. H. 1965 Dinitrophenylation and Inactivation of Bovine Pancreatic Ribonuclease A. Arch. Biochem. Biophys. 111, 209 - 222.

HORNE, R. W.
GREVILLE, G. D. 1963 Observations on Ox-Liver L-Glutamate Dehydrogenase with the Electron Microscope. J. Mol. Biol. 6, 506 - 509.

HUGO, W. B. 1954 The Preparation of Cell-Free Enzymes from Microorganisms. Bacteriol. Revs. 18, 87 - 105.

INOUE, H. SUZUKI, F. TANIOKA, H. TAKEDA, Y.	1968	Studies on ATP-Citrate-Lyase of Rat Liver. J. Biol. Chem. (Tokyo) 63, 89 - 100.
JOCELYN, P. C.	1972	Biochemistry of the SH-Group. Academic Press London, New York.
KINGDON, H. S. SHAPIRO, B. M. STADTMAN, E. R.	1967	Regulation of glutamine synthetase. VIII. ATP: Glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 58, 1703 - 1710.
KOHLMILLER, E. F. GEST, H.	1951	A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by Rhodospirillum rubrum. J. Bacteriol. 61, 269 - 282.
KÜMMEL, A.	1973	Anreicherung und Eigenschaften der Citrat-Lyase von Milchsäurebakterien. Diplomarbeit Göttingen.
LATHE, G. H. RUTHVEN, C. R. J.	1956	The Separation of Substances and Estimation of Their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water. Biochem. J. 62, 665 - 674.
LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L. RANDALL, R. J.	1951	Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
LYNEN, F.	1961	Biosynthesis of saturated fatty acids. Fed. Proc. 20, 941 - 951.
MAHADIK, S. P. SIVA RAMAN, C.	1968	Citrate Lyase: Molecular Weight and Subunit Structure. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 167 - 171.

MAJERUS, P. W. ALBERTS, W. A. VAGELOS, P. R.	1965	Acyl Carrier Protein. IV. The Identification of 4-Phosphopantetheine as the Prosthetic Group of the Acyl Carrier Protein. Biochemistry 53, 410 - 417.
MARKHAM, R. FREY, S. HILLS, G. J.	1963	Methods for the Enhancement of Image Detail and Accentuation of Structure in Electron Microscopy. Virology 20, 88 - 102.
MARTIN, R. G. AMES, B. N.	1961	A method for determining the sedimentation behavior: Application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372 - 1379.
MAURER, H. R.	1968	Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin.
MIDDLETON, B. TUBBS, P. K.	1974	An Enzyme-Bound Intermediate in the Biosynthesis of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A. Biochem. J. 137, 15 - 23.
MILDVAN, A. S.	1970	In: The Enzymes Vol. II, (Editor P. D. Boyer), Academic Press New York, London, S. 518.
MILNER, H. W. LAWRENCE, N. S. FRENCH, C. S.	1950	Colloidal Dispersion of Chloroplast Material. Science 111, 633 - 634.
MOELLERING, H. GRUBER, W.	1966	Determination of Citrate with Citrate Lyase. Anal. Biochem. 17, 369 - 378.
NAKAMURA, N.	1973	Effects of Acetylation with Acetic Anhydrid. Agr. Biol. Chem. 37, 569 - 574.
NEES, St. RICHTER, K.	1972	In: Anleitungsschrift der Firma Colora zum "Ultraphor", S. 80.

NEU, H. C. HEPPEL, L. A.	1967	The Release of Enzymes from Escherichia coli by Osmotic Shock and During the Formation of Spheroplasts. J. Biol. Chem. 240, 3685 - 3692.
VAN NIEL, C. B.	1944	The Culture, General-Physiology, Morphology and Classification of the Non-Sulfur Purple and Brown Bacteria. Bact. Rev. 8, 1 - 118.
PEACOCK, A. C. DINGMAN, C. W.	1968	Molecular Weight Estimation and Separation of Ribonucleic Acid by Electrophoresis in Agarose-Acrylamide Composite Gels. Biochemistry 7, 668 - 674.
PFENNIG, N. LIPPERT, K. D.	1966	Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 258 - 266.
PFENNIG, N.	1969	Rhodopseudomonas acidophila sp.n., a New Species of the Budding Purple Nonsulfur Bacteria. J. Bacteriol. 99, 597 - 602.
PLOWMAN, K. M. CLELAND, W. W.	1966	Kinetic Studies on Citrate Cleavage Enzyme. Fed. Proc. 25, 340.
PORATH, J. FLODIN, P.	1959	Gel-Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. Nature 183, 1657 - 1659.
PRETLOW, T. G. BOONE, C. W. SHRAGER, R. J.	1969	Rate zonal centrifugation in a ficoll gradient. Anal. Biochem. 29, 230 - 237.
PUGH, E. L. WAKIL, S. J.	1965	Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. J. Biol. Chem. 240, 4727 - 4733.

RADICHEVICH, J.
BECKER, M. M.
EITINGTON, M.
GETTLER, v. H.
TORALBALLA, G. C.
CALDWELL, M. L.
1959
Essential Groups of Porcine Pancreatic Amylase and of Taka Amylase. Acetylation with Acetic Anhydride.
J. Am. Chem. Soc. 81, 2845.

RESSLER, N.
LEE, S.
1970
Tissue characteristic forms of glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase.
Biochem. J. 119, 85 - 88.

RESSLER, N.
1973
A Systematic Procedure of the Determination for the Heterogeneity and Nature of Multiple Electrophoretic Bands.
Anal. Biochem. 51, 589 - 610.

REYNOLDS, J. A.
TANFORD, Ch.
1970
The Gross-Conformation of Protein-Sodium Dodecylsulfate Complexes.
J. Biol. Chem. 245, 5161 - 5165.

REYNOLDS, J. A.
TANFORD, Ch.
1970
Binding of Dodecylsulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 66, 1002 - 1007.

RIORDAN, J. F.
VALLEE, B. L.
1972
Acetylation.
In: Methods in Enzymology (C. H. W. Hirs und S. N. Timasheff, editors) Vol. XXV, 494 - 499.

RODBARD, D.
CHRAMBACH, A.
1970
Unified Theory for Gel Electrophoresis and Gel Filtration.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 65, 970 - 977.

RODBARD, D.
CHRAMBACH, A.
1971
Estimation of Molecular Radius, Free Mobility and Valence Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
Anal. Biochem. 40, 95 - 134.

ROSE, J. A. 1967 Mechanismn of aconitase action.
O'CONNEL, E. L. I. The hydrogen transfer reaction.
J. Biol. Chem. 242, 1870 - 1879.

SANADI, D. R. 1952 Studies on α-Ketoglutaric Oxidase.
LITTLEFIELD, J. W. II. Purification and Properties.
BOCK, R. M. J. Biol. Chem. 197, 851 - 862.

SANGER, F. 1949 Fractionation of Oxidized Insulin.
Biochem. J. 44, 126 - 128.

SCHAAB, Ch. 1972 Phototrophic Growth of Rhodopseu-
GIFFHORN, F. domonas gelatinosa on Citrate; Accu-
SCHOBERTH, S. mulation and Subsequent Utilization
PFENNIG, N. of Cleavage Products.
GOTTSCHALK, G. Z. Naturforsch. 27 b, 962 - 967.

SCHACHMAN, H. K. 1959 Ultracentrifugation in Biochemistry.
Academic Press New York and
London.

SCHMELLENKAMP, H. 1974 Mechanism of Enzymic Acetylation
EGGERER, H. of des-Acetyl Citrate Lyase.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 71,
1987 - 1991.

SHAPIRO, A. L. 1967 Molecular Weight Estimation of Poly-
VINUẼLA, E. peptide Chains by Electrophoresis
MAIZEL, Jr., J. V. in SDS-Polyacrylamide Gels.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28,
815 - 820.

SHAPIRO, B. M. 1969 The glutamine synthetase deadeny-
lating enzyme system from Escheri-
chia coli. Resolution in two compo-
nents, specific nucleotide stimulation
and cofactor requirements.
Biochemistry 8, 659 - 670.

SINGH, M. 1971 The Reaction Inactivation of Citrate
SRERE, P. A. Lyase from Aerobacter aerogenes.
J. Biol. Chem. 246, 3847 - 3850.

SINGH, M. BÖTTGER, B. STEWART, C. BROOKS, G. C. SRERE, P. A.	1973	S-Acetyl Phosphopantetheine: Deacetyl Citrate Lyase S-Acetyl Transferase from Klebsiella aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1 - 9.
SMITHIES, O.	1962	Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 125, (angegebene Literaturstelle nicht auffindbar, da in der sek. Literatur falsch zitiert).
SRERE, P. A.	1959	The Citrate Cleavage Enzyme. I. Distribution and Purification. J. Biol. Chem. 234, 2544 - 2547.
SRERE, P. A.	1965	Conformation Changes in Citrate-Condensing Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 110, 200 - 204.
SRERE, P. A. BÖTTGER, B. BROOKS, G. C.	1972	Citrate Lyase: A Pantothenate Containing Enzyme. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69, 1201 - 1202.
SRERE, P. A. LIPMANN, F.	1953	An enzymatic reaction between citrate, adenosine triphosphate and coenzyme A. J. Amer. Chem. Soc. 75, 4874.
STEGEMANN, H.	1972	Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese oder Fokussierung und ihre Zusatzteile. Z. Anal. Chem. 261, 388 - 391.
STEGEMANN, H.	1972	Arbeitsvorschrift zum Biochemischen Praktikum.
SUMPER, M. LYNEN, F.	1972	The Multienzyme Systems of Fatty Acid Biosynthesis. In: Protein-Protein Interactions (R. Jaenicke und E. Helmreich, eds.) Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York.

SWANK, R. T.
MUNKRES, K. D. 1971 Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate.
Anal. Biochem. 39, 462 - 477.

TAKAHASHI, H. 1958 Decomposition of citrate by microorganisms. VI. The effect of d-malate on the metabolism of citrate.
Chem. Abstr. 52, 20378.

TATE, S. S.
GRZYBOWSKI, A. K.
DATTA, S. P. 1964 The Acid Dissociations of the Keto and Enol Isomers of Oxaloacetic Acid at 25°.
J. Chem. Soc.,1372 - 1380.

TATE, S. S.
DATTA, S. P. 1965 The Equilibrium of the Reaction Catalyzed by Citrate Oxaloacetate Lyase.
Biochem. J. 94, 470 - 477.

TEIPEL, J.
KOSHLAND, Jr., D. E. 1969 The Significance of Intermediary Plateau Regions in Enzyme Saturation Curves.
Biochemistry 8, 4656 - 4663.

TSUIKI, S.
MUTO, A.
KIKUCHI, G. 1963 A possible route of acetate oxidation in Rhodopseudomonas spheroides.
Biochim. Biophys. Acta 69, 181 - 183.

UFFEN, R. L.
WOLFE, R. S. 1970 Anaerobic Growth of Purple Nonsulfur Bacteria under Dark Conditions.
J. Bacteriol. 104, 462 - 472.

VALENTINE, R. C.
SHAPIRO, B. M.
STADTMAN, E. R. 1968 Regulation of Glutamine Synthetase. XII. Electron Microscopy of the Enzyme from E. coli.
Biochemistry 7, 2143 - 2152.

VESTERBERG, O. 1971 Staining of protein zones after isoelectric focussing in polyacrylamide gels.
Biochim. Biophys. Acta 243, 345 - 348.

VIGNAIS, P. V. ZABIN, J.	1958	Synthesis and Properties of Palmityl Adenylate, Palmityl-Coenzyme A and Palmityl Glutathione. Biochem. Biophys. Acta 29, 263 - 269.
VITHAYATHIL, P. RICHARDS, F. M.	1960	Modification of the Amino Groups of the Peptide Component of Subtilisin-Modified Ribonuclease. J. Biol. Chem. 235, 1029 - 1037.
VRATSANOS, S. M.	1960	On the mechanism of enzyme action. LXXI. Acylations of trypsin in organic solvents. Arch. Biochem. Biophys. 90, 132 - 138.
WALSER, M.	1961	Ion Association. V. Dissociation Constants for Complexes of Citrate with Sodium, Potassium, Calcium and Magnesium Ions. J. Phys. Chem. 65, 159 - 161.
WALSH, Ch. T. SPECTOR, L. B.	1969	Citryl Phosphate and the Mode of Action of the Citrate Cleavage Enzyme. J. Biol. Chem. 244, 4366 - 4374.
WARBURG, O. CHRISTIAN, W.	1942	Isolierung und Kristallisierung des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. 310, 384 - 421.
WARD, R. L. SRERE, P. A.	1965	A magnetic resonance study on the citrate lyase of S. diacetilactis. Biochim. Biophys. Acta 99, 270 - 274.
WEBER, K. OSBORN, M.	1969	The Reliability of Molecular Weight. Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.
WEBER, K. PRINGLE, J. R. OSBORN, M.	1972	Measurement of Molecular Weight by Electrophoresis on SDS-Polyacrylamide Gels. In: Methods in Enzymology (C. H. W. Hirs und S. N. Timasheff, editors) Vol. XXVI, 3 - 27.

WHEAT, R. W. AJL, S. J.	1955	Citritase, the Citrate-Splitting Enzyme from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 217, 897 - 907.
WHEAT, R. W. AJL, S. J.	1955	Citritase, the Citrate-Splitting Enzyme from E. coli. II. Reaction Mechanisms. J. Biol. Chem. 217, 909 - 920.
WHITAKER, J. R.	1963	Determination of molecular weights of proteins by gelfiltration on sephadex. Anal. Chem. 35, 1950 - 1953.
WHITE, Jr., F. H.	1960	Regeneration of Enzymatic Activity by Air-Oxidation of Reduced Ribonuclease with Observations on Thiolation During Reduction with Thioglycolate. J. Biol. Chem. 235, 383 - 389.
WILLMS, Ch. R. OLIVER, R. M. HENNEY, Jr., H. R. MUKHERJEE, B. B. REED, L. J.	1967	α-Keto Acid Dehydrogenase Complexes. J. Biol. Chem. 242, 889 - 897.
WOOLF, B.	1932	Allgemeine Chemie der Enzyme (J. B. S. Haldane und K. G. Stern, Hrsg.) Dresden und Leipzig Steinkopf Verlag, S. 119.
WRIGLEY, C.	1968	Gel-Electrofocusing - A Technique for Analyzing Multiple Protein Samples by Isoelectric Focusing. Science Tools 15, 17 - 28.
YPHANTIS, D. A.	1964	Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions. Biochemistry 3, 297 - 317.
YOSHINO, M. TAKAGI, T.	1973	Molecular Weight Determination by 6 M Guanidine Gel-Filtration Using Fluorescent-Labelled Proteins. Anal. Biochem. 54, 290 - 293.

ZIPPER, P.
KRATKY, O.
HERRMANN, R.
HOHN, Th.

1971 An X-Ray Small Angle Study of the Bacteriophages fr and R 17.
Eur. J. Biochem. 18, 1 - 9.

Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk danke ich für die Überlassung des Themas, für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und die stets gewährte Hilfe bei der Bewältigung experimenteller und theoretischer Probleme.

Ich danke Frau Dr. Ellen-M. Gottschalk für die exakte Durchführung der Experimente mit der analytischen Ultrazentrifuge.

Nichtzuletzt gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. F. Mayer für die umfassende elektronenmikroskopische Untersuchung der Citrat-Lyase.

Lebenslauf

Ich wurde am 22. April 1948 in Göttingen geboren. Nach vierjährigem Besuch der Grundschule wechselte ich 1958 am gleichen Ort auf das Felix-Klein-Gymnasium über. Dort legte ich am 19. September 1966 die Reifeprüfung ab. Am 17. Oktober 1966 immatrikulierte ich mich an der Georg-August Universität zu Göttingen und begann hier mit dem Studium der Biologie. Nach der bestandenen Zwischenprüfung im Sommersemester 1968, absolvierte ich im Winter-/Sommersemester 69/70 am Institut für Mikrobiologie die Großpraktika. Im Oktober 1970 bestand ich den mündlichen Teil des Diplomexamens und begann danach mit der Anfertigung meiner Diplomarbeit mit dem Thema: "Zur Funktion des reductiven Carbonsäure-Cyclus in Chlorobium thiosulfatophilum und Rhodospirillum rubrum". Im September 1971 erlangte ich den Grad eines Diplom-Biologen an der Georg-August Universität. Im Oktober 1971 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation, deren experimentellen Teil ich im März 1974 abschloß.